



CN 53-1040/Q ISSN 0254-5853

动物学研究

ZOOLOGICAL RESEARCH

第33卷 第5期 Vol.33 No.5
2012年10月





中国科学院昆明动物研究所 中国动物学会 主办
科学出版社 出版

ZOOLOGICAL RESEARCH

Vol.33, No.5 Oct., 2012

CONTENTS

Articles

Natural fruit colour selection by frugivorous birds in Xishuangbanna
······ *DUAN Qiong, QUAN Rui-Chang* (427)

Seasonal feeding site selection of the Nonggang Babbler (*Stachyris nonggangensis*) in Nonggang, Guangxi, China
······ *YANG Gang, LU Zhou, YU Chen-Xing, JIANG Ai-Wu, MENG Yuan-Jun, ZHOU Fang* (433)

Nested species subsets of amphibians and reptiles in Thousand Island Lake
······ *WANG Xi, WANG Yan-Ping, DING Ping* (439)

Ultrastructure of *Ericerus pela* (Chavannes) nymph mouthparts and Ecological adaptations
······ *ZHAO Jie-Jun, CHEN Xiao-Ming, WANG Zi-Li, YE Shou-De, CHEN Yong, WANG Shao-Yun* (447)

Characterization of the structure, function and regulation of the chicken mir-17-92 cluster
······ *YAN Xiao-Hong, WANG Zhi-Peng, WANG Ning* (455)

DNA barcoding and species and subspecies classification within genus *Carassius*
······ *CHENG Lei, CHANG Yu-Mei, LU Cui-Yun, CAO Ding-Cheng, SUN Xiao-Wen* (463)

cDNA cloning and expression analysis of *MSTN* gene from *Schizopygopsis pylzovi*
······ *CHAO Yan, ZHAO Lan-Ying, LI Chang-Zhong, XIE Bao-Sheng, SHEN Zhi-Xin, WANG Guo-Jie, WANG Zhen-Gang, LI Chao, BAI Bin-Qiang, ZHANG Hui, QI De-Lin* (473)

Cloning, physical and chemical property analysis of the Japanese sea bass Wap65-2 gene and its expression following *Vibrio harveyi* infection
······ *SHI Yu-Hong, CHEN Jiong, GAO Shan-Shan, SHEN Guang-Qiang, LU Xin-Jiang, LI Ming-Yun* (481)

Analysis of differentially expressed genes from female and male postparasitic *Ovomermis sinensis* juveniles
······ *WU Yun-Mei, ZHANG Li-Hong, WANG Guo-Xiu* (487)

Mice cope with parabiosis — Assessment of their physiological changes of life
······ *ZHANG Fu-Xiang, YANG Yi-Bin, KE Gui-Bao, CHEN Ying, XU Xin-Mei, TAN Zhou-Ke, RONG Song* (493)

Aging affects early stage direction selectivity of MT cells in rhesus monkeys
······ *LIANG Zhen, CHEN Yue-Ming, MENG Xue, WANG Yi, ZHOU Bao-Zhuo, XIE Ying-Ying, HE Wen-Sheng* (498)

Effects of three antigens extracted from *Vibrio vulnificus* on the immunological protection of *Nibea albiflora*
······ *YAN Mao-Cang, SHAN Le-Zhou, CHEN Shao-Bo, XIE Qi-Lang* (503)

Reviews

Diversity and development of positional behavior in non-human primates
······ *ZHANG Jing, QI Xiao-Guang, ZHANG Kan, ZHANG Pei, GUO Song-Tao, WEI Wei, LI Bao-Guo* (511)

Progress in cathelicidins antimicrobial peptides research
······ *GUANG Hui-Juan, LI Zheng, WANG Yi-Peng, LAI Ren, YU Hai-Ning* (523)

Progress in activity-dependent structural plasticity of neural circuits in cortex
······ *RAO Xiao-Ping, XU Zhi-Xiang, XU Fu-Qiang* (527)

SAMHD1—A HIV-1 restriction factor derived from myeloid lineage monocytes
······ *LI Pei-Lu, CHEN Qian-Qian, ZHANG Chi-Yu* (537)

Notes

First record of Van sung's shrew (*Chodsigoa caovansunga*) in China
······ *HE Kai, DENG Ke, JIANG Xue-Long* (542)

White-tailed Lapwing *Vanellus leucurus*—A newly recorded of bird in China
······ *DING Jin-Qing, MA Ming* (545)

Zoological Research Websites: http://www.zoores.ac.cn; http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed; http://www.wanfangdata.com.cn; http://dwxy.chinajournal.net.cn; http://www.ceps.com.tw; http://www.bioline.org.br/

动 物 学 研 究 2012，Oct. 33(5): 427−432 CN 53-1040/Q ISSN 0254-5853
Zoological Research DOI：10.3724/SP.J.1141.2012.05427

西双版纳食果鸟对植物果实颜色的取食选择

段 琼[1,2], 权锐昌[1,*]

(1. 中国科学院西双版纳热带植物园, 云南 西双版纳 666303; 2. 中国科学院研究生院，北京 100049)

摘要：黑色和红色是最主要的果实颜色。虽然食果鸟的取食选择常被假设为果实颜色特征形成的主要进化动力, 但能直接支持该假说的研究案例极少。该研究选择西双版纳常见的 5 种食果鸟, 利用试验当季常见的黑、红、黄、绿 4 种果实进行室内和野外环境(开阔林地、林冠下层)果实颜色选择实验。结果表明, 室内试验时 5 种食果鸟最喜欢的果实颜色是黑色和/或红色, 而野外环境下, 虽然开阔林地果实被取食总量远大于林冠下层果实被取食量, 但黑色和红色仍均为该两类生境中被取食最多的果实颜色。即大部分食果鸟均喜好自然界最常见的果实颜色, 其喜好程度能反映研究地果实颜色组成分布格局, 提示果实颜色的进化或部分来自于食果鸟取食选择的压力。

关键词：果实颜色; 林缘; 林下; 动植物关系; 果实颜色比例格局
中图分类号：Q958.12 **文献标志码：**A **文章编号：**0254-5853-(2012)05-0427-06

Natural fruit colour selection by frugivorous birds in Xishuangbanna

DUAN Qiong[1,2], QUAN Rui-Chang[1,*]

(1. *Xishuangbanna Tropical Botanical Garden, the Chinese Academy of Sciences, Xishuangbanna Yunnan* 666303, *China*;
2. *Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing* 100049, *China*)

Abstract: Black and red are the most common colors of fruit, but the reason behind this has been subject to debate. Food preferences of avian frugivores for certain colors of food have been proposed as a selection mechanism that explains these traits, but there is little evidence supporting this hypothesis. Here, we conducted a lab experiment using four colors of natural fruit to evaluate color preferences of five avian species, and we also conducted this experiment in open area and understory habitats. Our results showed that red and black fruits were selected most often in lab experiment; in field experiment, red and black fruits were also the most preferred food, but the total amount of consumed fruits differed significantly between open areas and understory habitats. Our study suggested that differences in color preferences among frugivores may potentially reflect the diversity of fruit color and frequency in Xishuangbanna.

Key words: Fruit color; Forest edge; Understory; Plant-animal interaction; Fruit color distribution pattern

大部分陆生植物依赖食果动物为其传播种子和花粉, 如植物通过产生鲜艳的花或果实来吸引传粉者和种子散布者。因此, 颜色常被认为是增大被传播媒介发现几率的适应结果 (Willson & Whelan, 1990; Schmidt et al, 2004; Lomáscolo et al, 2010)。自然界最常见的果实颜色是与自然背景颜色对比度最大的黑色和红色, 占所有成熟果实的 50%～70% (Wheelwright & Janson, 1985; Willson & Whelan, 1990; Lee et al, 1994; Schmidt et al, 2004)。若果实颜色在吸引传播者中起信号作用, 那么黑色和红色被食果动物发现和捕食的几率也相对较大。但是, 到目前为止, 果实颜色与食果动物取食选择之间的相互关系仍不清楚。

为了探究种子散布者在果实颜色演化中的意义, 很多研究利用野外捕获的食果鸟来进行实验, 结果各异。虽然部分研究发现食果鸟有特定的颜色偏好 (McPherson, 1988; Willson & Comet, 1993; Willson, 1994; Puckey et al, 1996; Siitari et al, 1999; Hartley et al, 2000), 但还有一些研究表明食果鸟取食选择与果实颜色无关或关系很弱, 且该选择在种

收稿日期：2012-05-10；接受日期：2012-06-01
基金项目：中国科学西部博士基金和中科院青年科技人员方向项目(KSCX2-EW-Q-17)
*通信作者(Corresponding author)，权锐昌, E-mail: quanrc@xtbg.ac.cn
第一作者简介：段琼(1987−), 女, 云南丽江人, 硕士研究生, 主要从事动植物关系研究

内和种间存在很大差异 (Willson & Whelan, 1990; Willson & Comet, 1993)。然而这些研究多来自美洲或欧洲, 几乎没有来自热带亚洲的相关报道, 尽管热带亚洲拥有全球最丰富的食果鸟种类 (Corlett, 1998), 且主要依靠鸟类传播种子而不同于热带美洲依靠蝙蝠传播种子 (Ingle, 2003; Muscarella & Fleming, 2007)。因此, 热带亚洲是探讨食果鸟取食选择与果实颜色相互关系的理想之地。

除颜色外, 影响食果鸟选择食物的因素仍很多, 如果实大小、软硬度、可食性、营养成分和果实产量等 (Gautier-Hion et al, 1985; Whelan & Willson, 1994; Schaefer et al, 2007)。由于鸟类主要依靠视觉搜索食物, 颜色无疑是影响食果鸟选择食物的主要因素之一 (Schaefer, 2011)。Lomáscolo et al (2010) 在分子水平分析植物果实的性状演化历史, 发现颜色不同于其他性状, 其产生与演化无法用系统进化来解释, 而与食果鸟的选择等环境因素关系更为密切。食果鸟具有高度发达的四色视觉系统, 可见光范围为 300～700 nm(人类为 400～700 nm)(Vorobyev & Osorio, 1998)。果实颜色作为第一视觉信号无疑是食果鸟选择食物最重要的影响因素 (Schaefer, 2011)。一些研究采用人工果实的方法来单一讨论颜色与取食的关系 (Levey & Grajal, 1991; Whelan & Willson, 1994; Alves - Costa & Lopes, 2001), 但自然情况更为复杂, 如果直接利用自然果实试验也能得出相似的结论或许能更好解释食果鸟对果实颜色的取食选择。

此外, 生境对食果鸟的食物选择也有很大影响。在热带雨林中, 林冠与林下的光照、湿度和温度等较大环境因素差异(Molofsky & Augspurger, 1992; Becerra et al, 2004; Ayres et al, 2009)导致了林冠与林下的不同动、植物的组成及其生活习性 (Munn & McDaniel, 1985; Canham, 1988)。林冠光照环境较稳定, 植物果实林冠更为丰富, 因此, 大部分食果鸟均活动于林冠或光线充足的开阔地, 且较少在垂直方向来回活动。而在林下分布较多的食虫或杂食性鸟通常采取机会式的取食果实方式 (Malmborg & Willson, 1988; Loiselle & Blake, 1991)。因此, 不同生境下食果鸟的果实颜色选择可能不同。

西双版纳位于热带亚洲北缘, 已经调查的该地 626 种高等植物果实颜色组成比例表明, ～40%为黑色, 19%为红色, 13%为棕色, 13%为黄色, 8%为双色, 4%为绿色, 2%为白色以及 1%为蓝色 (Chen et al, 2004)。如果食果鸟取食影响果实颜色进化, 我们首先假设食果鸟对果实某些颜色表现强烈偏好, 自然界高比例的果实颜色应该被更多的鸟类所选择。其次, 如果颜色是影响取食选择的主要因素, 那么不同的光照环境对取食选择影响则相对较小。

1 材料与方法

1.1 实验地点与材料

选择西双版纳热带植物园为野外实验地点。沟谷雨林林冠连续, 林下光照弱, 而野菜园林冠开阔, 林下光照强。两者分别代表不同光照条件的生境试验材料包括室内试验所需的食果鸟和植物果实。食果鸟为由野外迷网捕获的 10 只红耳鹎, 8 只黑冠黄鹎, 4 只蓝喉拟啄木鸟, 2 只灰眼短脚鹎, 和 2 只褐脸雀鹛。为避开繁殖影响, 所有试验用鸟在 2011 年 1 月—2 月获得并单独饲养于 30 cm×30 cm×40 cm 的鸟笼内, 自由饮水, 试验前主要食物为苹果、梨、芭蕉、小鸡饲料和少量面包虫。

植物果实选取试验当季大量成熟, 在野外观察到有食果鸟采食, 并能反映西双版纳果实颜色不同组成比例格局的 4 种果实, 颜色分别为黑色、红色、黄色和绿色。黑果采自潺槁木姜子 (*Litsea glutinosa*), 乔木, 成熟果实为黑色; 红果采自催吐萝芙木 (*Rauvolfia vomitoria*), 乔木, 果实从最初的绿色转为橙黄色，最后成熟时为红色; 黄果采自假连翘 (*Duranta erecta*), 小乔木, 四季挂果, 成熟果实为黄色, 观察到的食果鸟拜访次数较少; 绿果采自布渣叶 (*Microcos nervosa*), 绿色, 未成熟果实为绿色, 果期很长, 观察到食果鸟取食, 成熟果实为黑褐色, 成熟期很短。所有试验用果大小、形状和软硬度等均相似, 直径 6～8 mm, 圆球形, 较硬。

1.2 实验设计

1.2.1 果实颜色测定 鸟类与人的视觉系统差异大, 利用仪器测量各颜色光谱更能准确描述果实颜色。为避免肉眼对颜色分辨造成的误差, 我们使用海洋光学公司生产的 USB4000 光谱仪测量各颜色光谱，标准光源为海洋光学公司生产的氘卤 DT-MINI-2-GS 光源。各个被测物的反射率通过标准白光对照 (Top Sensor Systems WS-1-SS) 校准。为避免环境光干扰，光纤探头 (QR400-2-UV-BX, Ocean Optics)固定于黑色塑料管中进行测量, 测量角度为 45°。每个颜色的植物果实各测量 6 个, 取平

均值作为各颜色植物果实的反射率。最后将光谱测量值以 20 nm 的间隔平均值用 SigmaPlot 软件作 300～700 nm 波长范围的光谱图。

1.2.2　室内果实颜色选择　试验集中在 2011 年 7—8 月，每天的试验时间为 9:00—11:00 和 13:00—15:00。试验前一天下午采集植物果实，4 ℃保存。所有试验用鸟在试验前 1～1.5 h 不喂食，以确保试验时每个个体都有相似的取食意向。试验时每只试验鸟提供 32 粒果实(4 种颜色×8 粒)以确保提供的食物总量远大于实际取食量，15 min 后取出摆放食物的培养皿计数剩余的果实数量，从而确定每次实验时各颜色果实的取食数量。每个试验重复 8 次，持续 3～5 d。

1.2.3　野外果实颜色选择　试验时间为 2011 年 7—8 月。试验开始前，在沟谷雨林和野菜园分别选取能反映光照强、弱的 16 株高度为 2～3 m 的灌木或小乔木用于人工挂果。为了避免树间隔太近所导致的数据不独立，树间距≥5 m。挂果时，选取每棵树高度在 1.5 m 处的 2 个枝条，用面糊在该枝条中部固定 20 个同一颜色的果子。每个颜色果实挂 4 棵树。每天 7:00 开始试验，17:00 结束试验并检查记录被取食数量，持续 10 天/重复 10 次。每天试验开始前更换所有果实以确保每次重复试验时果实新鲜程度一致。为避免空间位置影响鸟类的果实选择，每棵树每天随机更换不同颜色的果实。

1.2.4　数据分析　x^2-检验及 Mann-Whitney U-tests 检测食果鸟对果实颜色的取食偏好，所有数据分析在 SPSS 16.0 中完成。

2　结　果

2.1　果实颜色光谱值

黑、红、黄、绿 4 种颜色的植物果实光谱分布如图 1，每个颜色的光谱最高反射率都与各颜色标准波长范围一致 (黑色光反射率几乎为零；红色为 630～750 nm；黄色为～600 nm；绿色为～550 nm)，能真实代表这 4 种选定的果实颜色。

2.2　室内果实颜色选择

5 种实验用鸟均对 4 种果实颜色表现强烈偏好(红耳鹎：x^2=127.6, df=3, P=0.000, n=80；黑冠黄鹎：x^2=29.3, df=3, P=0.000, n=64；褐脸雀鹛：x^2=52.7, df=3, P=0.000, n=16；灰眼短脚鹎：x^2=12.7, df=3, P=0.005, n=16；蓝喉拟啄木鸟：x^2=53.1, df=3, P=0.000, n=32)。红耳鹎(10 只)偏好红色果实；黑冠黄鹎 (8 只)，灰眼短脚鹎(2 只)和蓝喉拟啄木鸟(4 只)黑色和红色果实好；而褐脸雀鹛(2 只)则偏好黑色果实(图 2)。

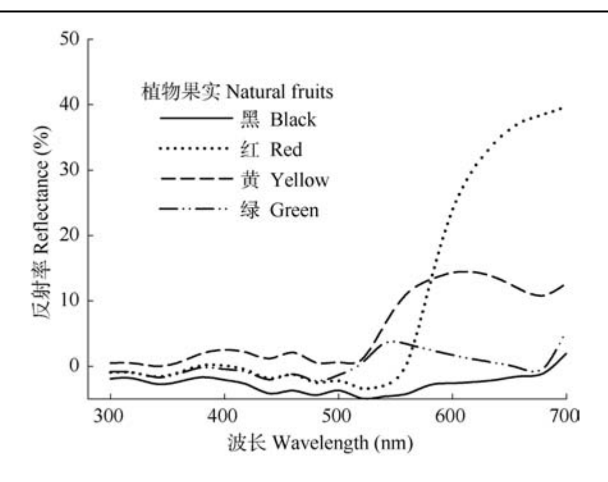


图 1　植物果实 (黑、红、黄、绿)在 300～700 nm 范围内的光谱图

Fig. 1　Spectra of natural fruits from 300−700 nm illustrating true colory

2.3　野外果实颜色选择

无论在光线较弱的沟谷雨林林下还是在光线充足的开阔地野菜园，食果鸟都对果实颜色有明显的选择偏好(沟谷林林下：x^2=9.7, df=3, P=0.022；野菜园开阔地：x^2=84.1, df=3, P=0.000)。红色和黑色均为这两类生境中食果鸟最喜好的果实颜色，二者差异不显著 (x^2= 0.001, df =1, P>0.05)。但在开阔地野菜园被消耗的果实总量要远远高于沟谷林林下的消耗量 (x^2=73.4, df=1, P=0.000) (图 3)。

3　讨　论

通过选择代表自然界果实颜色组成分布比例从多到少的 4 种果实(黑、红、黄、绿)来进行食果鸟取食颜色选择试验，我们发现无论是室内还是野外试验，食果鸟均对果实颜色表现强烈的取食偏好(图 2, 3)。该结果不同于已有的来自亚洲以外的很多相关研究，此类研究大多表明食果鸟对果实颜色没有选择或呈现弱选择，且这些选择有些只是暂时的，会随环境而改变 (Willson & Whelan, 1990; Willson & Comet, 1993; Schmidt et al, 2004)。这些结论上的差异或许归因于热带亚洲所拥有的全球最多的食果鸟种类 (Corlett, 1998)，且该地区森林更新也主要依赖鸟类传播种子而不同于热带美洲主要依靠蝙蝠散布种子 (Ingle, 2003; Muscarella & Fleming, 2007)。鸟类主要依靠视觉搜寻食物，因此在热带亚

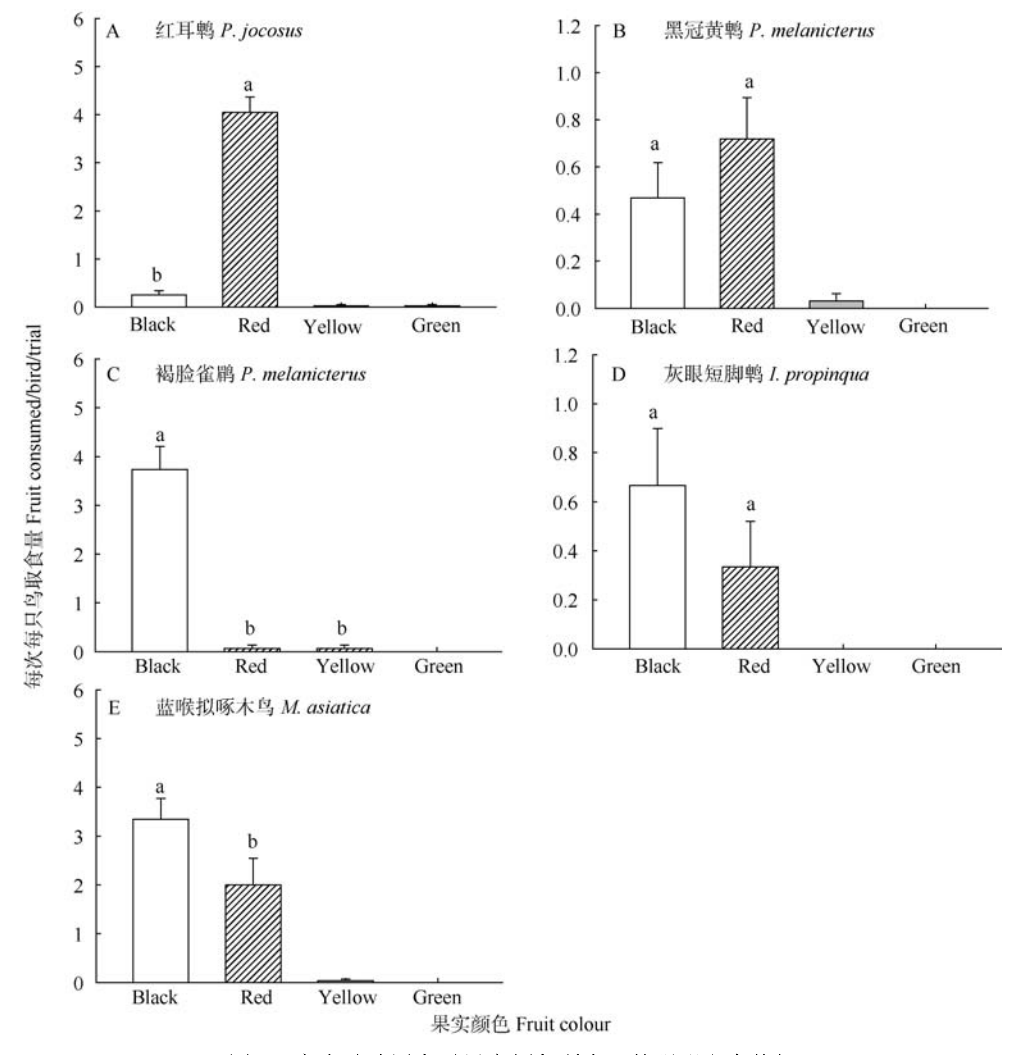


图 2 室内试验用鸟对果实颜色所表现的强烈取食偏好

Fig. 2 Each species showed a strong preference for certain color

A) 红耳鹎(n=10); B) 黑冠黄鹎(n=8); C) 褐脸雀鹛(n=2); D) 灰眼短脚鹎(n=2); E) 蓝喉拟啄木鸟(n=4)。P<0.05.

A) *P. jocosus* (n=10); B) *P. melanicterus* (n=8); C) *A. poioicephala* (n=2); D) *I. propinqua* (n=2); E) *M. asiatica* (n=4). P<0.05.

柱子上不同字母(a, b)表示统计差异(P<0.05)。

Different letters above each bar indicate statistical significance at P<0.05.

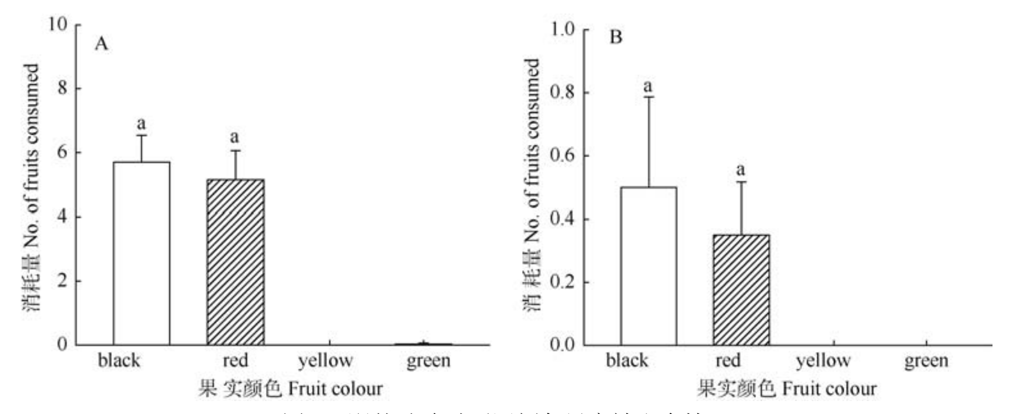


图 3 野外试验时不同颜色果实被取食情况

Fig. 3 Consummation of different color fruits in open field experiment

A) 开阔地野菜园；B) 沟谷雨林林下。

A) Open area；B) Understory.

柱子上相同字母(a)表示无统计差异（）(P>0.05)。

Same letters (a) above each bar indicated not significantly different (P>0.05).

洲为代表的旧大陆地区，食果鸟与果实颜色的相互关系要比在热带美洲等新大陆地区更加紧密。

试验中，所有鸟类均对颜色表现强烈的选择偏好。其中，红耳鹎显著偏好红色果实；褐脸雀鹛则更加集中取食黑色果实，且这两种鸟都几乎只选择一种颜色的果实。黑冠黄鹎、灰眼短脚鹎和蓝喉拟啄木鸟均取食两种颜色的植物果实(红色和黑色)，对果实颜色的选择范围相对较宽。虽然营养是影响取食的重要因素之一 (Schaefer et al, 2008b; Wellmann & Downs, 2009)，但我们的研究结果更支持颜色的主导影响地位。实验时所有的鸟类均给予相同的 4 种植物果实，若营养决定最终取食选择，那么所有的鸟类或许都会集中取食某一种营养最高的果实，但本试验结果难以支持该推理，如红耳鹎和褐脸雀鹛的选择则完全不同。同时，我们也注意到颜色对比度也会在一定程度上影响取食选择，红色和黑色与自然界常见的绿色背景间的颜色对比度大，易于被鸟类发现并取食 (Cazetta et al, 2007; Schaefer et al, 2008a)，这或许也是红色和黑色被取食最多的原因之一。当然，食果鸟对黑色和红色的喜好可能还是由于该颜色是某些特殊营养的指示，如花青素等抗氧化合物在红色和黑色果实中含量较多，而有些研究支持鸟类能够识别并选择含有较高浓度花青素的食物 (Schaefer et al, 2008a; Schaefer, 2011)。但本试验所选取的红色和黑色果实是否也含有较高浓度的花青素还需要进一步验证。

由于不同实验材料和研究地点间鸟类组成的差异，食果鸟颜色选择的野外试验结果差异很大。如 Galetti et al (2003) 应用粘土制成的红、黑、白 3 种人工果实来研究野外环境下不同颜色果实的被取食情况，发现黑色和红色是野外环境下被取食最多的果实颜色。而 Willson & Melampy (1983)和 Traveset & Willson (1998) 的研究结果则表明野外环境下无颜色选择差异。本研究的野外试验则得到了类似 Galetti et al (2003)的结果，在光照较弱的沟谷雨林林下和光照较强的野菜园，黑色和红色果实的被取食量均为最大值。野菜园被取食的红色和黑色果实总量远大于其在沟谷雨林林下被取食的数量，这或许是由于野菜园的食果鸟种类和数量多于沟谷林林下(段琼，未发表数据)。同时，野菜园视野宽阔，黑色和红色因其与背景颜色间的较高对比度易于被远距离发现，这也会导致野菜园的果实被取食量相对较多。

本研究是在热带亚洲完成的有关果实颜色与食果鸟食物选择相互关系的少数研究之一。结果表明常见的食果鸟均表现强烈取食颜色偏好，且主要为黑色和红色。但同时，这些食果鸟也取食少量的其他颜色果实。因此，我们认为食果鸟对果实颜色的选择格局在一定程度反映了自然界果实颜色比例分布格局，如：颜色比例最高的红色和黑色是被取食最多的果实颜色，而比例较低的黄色和绿色被取食的比例也相对较低。

致谢：感谢西南林业大学的刘锋和李焕对野外工作的支持与帮助；感谢李梦帮助捕获及饲喂试验用鸟。湖北大学的甘文瑾博士研究生在颜色光谱测量上给予了无私帮助，两位评委对文章的初稿提出了宝贵意见及建议，在此一并致谢。

参考文献：

A lves-Costa CP, Lopes AV. 2001. Using artificial fruits to evaluate fruit selection by birds in the field [J]. *Biotropica,* **33**(4): 713-717.

Ayres E, Steltzer H, Simmons BL, Simpson RT, Steinweg JM, Wallenstein MD, Mellor N, Parton WJ, Moore JC, Wall DH. 2009. Home-field advantage accelerates leaf litter decomposition in forests [J]. *Soil Biol Biochem,* **41**(3): 606-610.

Becerra PI, Celis‐Diez JL, Bustamante RO. 2004. Effects of leaf litter and precipitation on germination and seedling survival of the endangered tree Beilschmiedia miersii [J]. *Appl Veg Sci,* **7**(2): 253-257.

Canham CD. 1988. Growth and canopy architecture of shade-tolerant trees: response to canopy gaps [J]. *Ecology,* **69**(3): 786-795.

Cazetta E, Schaefer HM, Galetti M. 2007. Why are fruits colorful? The relative importance of achromatic and chromatic contrasts for detection by birds [J]. *Evol Ecol,* **23**(2): 233-244.

Chen J, Fleming TH, Zhang L, Wang H, Liu Y. 2004. Patterns of fruit traits in a tropical rainforest in Xishuangbanna, SW China [J]. *Acta Oecol,* **26**(2): 157-164.

Corlett RT. 1998. Frugivory and seed dispersal by vertebrates in the Oriental (Indomalayan) Region [J]. *Biol Rev,* **73**(4): 413-448.

Galetti M, Alves-Costa CP, Cazetta E. 2003. Effects of forest fragmentation, anthropogenic edges and fruit colour on the consumption of ornithocoric fruits [J]. *Biol Conserv,* **111**(2): 269-273.

Gautier-Hion A, Duplantier JM, Quris R, Feer F, Sourd C, Decoux JP, Dubost G, Emmons L, Erard C, Hecketsweiler P. 1985. Fruit characters as a basis of fruit choice and seed dispersal in a tropical forest vertebrate community [J]. *Oecologia,* **65**(3): 324-337.

Hartley L, Waas J, O'Connor C, Matthews L. 2000. Colour preferences and coloured bait consumption by weka Gallirallus australis, an endemic New Zealand rail [J]. *Biol Conserv,* **93**(2): 255-263.

Ingle NR. 2003. Seed dispersal by wind, birds, and bats between Philippine montane rainforest and successional vegetation [J]. *Oecologia,* **134**(2): 251-261.

Lee WG, Weatherall I, Wilson JB. 1994. Fruit conspicuousness in some New Zealand Coprosma (Rubiaceae) species [J]. *Oikos,* **69**(1): 87-94.

Levey DJ, Grajal A. 1991. Evolutionary implications of fruit-processing limitations in cedar waxwings[J]. *Am Nat,* **138**(1): 171-189.

Loiselle BA, Blake JG. 1991. Temporal variation in birds and fruits along an elevational gradient in Costa Rica [J]. *Ecology,* **72**(1): 180-193.

Lomáscolo SB, Levey DJ, Kimball RT, Bolker BM, Alborn HT. 2010. Dispersers shape fruit diversity in Ficus (Moraceae) [J]. *Proc Natl Acad Sci USA,* **107**(33): 14668-14672.

Malmborg PK, Willson MF. 1988. Foraging ecology of avian frugivores and some consequences for seed dispersal in an Illinois woodlot [J]. *Condor,* **90**(1): 173-186.

McPherson JM. 1988. Preferences of cedar waxwings in the laboratory for fruit species, colour and size: a comparison with field observations[J]. *Anim Behav,* **36**(4): 961-969.

Molofsky J, Augspurger CK. 1992. The effect of leaf litter on early seedling establishment in a tropical forest [J]. *Ecology,* **73**(1): 68-77.

Munn L, McDaniel P. 1985. Effect of temperature on organic carbon-texture relationships in Mollisols and Aridisols [J]. *Soil Sci Soc Am J,* **49**(6): 1486-1489.

Muscarella R, Fleming TH. 2007. The role of frugivorous bats in tropical forest succession [J]. *Bioll Rev,* **82**(4): 573-590.

Puckey HL, Lill A, O'Dowd DJ. 1996. Fruit color choices of captive silvereyes (Zosterops lateralis) [J]. *Condor,* **98**(4): 780-790.

Schaefer HM. 2011. Why fruits go to the dark side [J]. *Acta Oecol,* **37**(6): 604-610.

Schaefer HM, McGraw K, Catoni C. 2008a. Birds use fruit colour as honest signal of dietary antioxidant rewards [J]. *Funct Ecol,* **22**(2): 303-310.

Schaefer HM, Schaefer V, Vorobyev M. 2007. Are fruit colors adapted to consumer vision and birds equally efficient in detecting colorful signals? [J]. *Am Nat,* **169**(S1): S159-S169.

Schaefer HM, Spitzer K, Bairlein F. 2008b. Long-term effects of previous experience determine nutrient discrimination abilities in birds [J]. *Front Zool,* **5**(1): 4.

Schmidt V, Martin Schaefer H, Winkler H. 2004. Conspicuousness, not colour as foraging cue in plant–animal signalling [J]. *Oikos,* **106**(3): 551-557.

Siitari H, Honkavaara J, Viitala J. 1999. Ultraviolet reflection of berries attracts foraging birds. A laboratory study with redwings (*Turdus iliacus*) and bilberries (*Vaccinium myrtillus*) [J]. *P Roy Soc B- Biol Sci,* **266**(1433): 2125-2129.

Traveset A, Willson MF. 1998. Ecology of the fruit-colour polymorphism in Rubus spectabilis [J]. *Evol Ecol,* **12**(3): 331-345.

Vorobyev M, Osorio D. 1998. Receptor noise as a determinant of colour thresholds[J]. *P Roy Soc B-Biol Sci,* **265**(1394): 351-358.

Wellmann A, Downs C. 2009. Sugar preferences and digestion by Cape white-eyes, Zosterops virens, fed artificial fruit diets [J]. *Afr Zool,* **44**(1): 106-116.

Wheelwright NT, Janson CH. 1985. Colors of fruit displays of bird-dispersed plants in two tropical forests [J]. *Am Nat,* **126**(6): 777-799.

Whelan CJ, Willson MF. 1994. Fruit choice in migrating North American birds: field and aviary experiments [J]. *Oikos,* **71**(1): 137-151.

Willson MF. 1994. Fruit choices by captive American robins [J]. *Condor,* **96**(2): 494-502.

Willson MF, Comet TCA. 1993. Food choices by northwestern crows: experiments with captive, free-ranging and hand-raised birds [J]. *Condor,* **95**(3): 596-615.

Willson MF, Melampy MN. 1983. The effect of bicolored fruit displays on fruit removal by avian frugivores [J]. *Oikos,* **41**(1): 27-31.

Willson MF, Whelan CJ. 1990. The evolution of fruit color in fleshy-fruited plants [J]. *Am Nat,* **136**(6): 790-809.

遵义医学院器官移植实验室学科团队简介

遵义医学院器官移植实验室建立于 2006 年，六年来一直致力于以小动物各种器官移植为基础、以器官移植免疫排斥及缺血再灌注损伤与细胞信号传导关系为方向的实验性研究。实验室在学校的大力支持下已颇具规模，拥有各种大型相关实验设备及完善的配套设施。目前研究团队中拥有正高职称人员三名、副高二名，拥有博士学位人员三名。多人主持及完成多项国家自然科学基金及省部级科研基金，其中团队负责人容松目前正在主持 2011 年国家自然科学基金项目（81160096）“PKC beta 对小鼠肾移植后肾脏内细胞浸润的影响”。已主持完成国家自然科学基金（30860277）“蛋白激酶 C 缺失对小鼠肾移植物的影响”并已证实 PKC beta 在肾缺血再灌注/免疫排斥方面有明显的影响作用，PKC beta 缺失可以改善移植物的存活质量及生存率，并完成大小鼠肾、心脏移植模型的改进创立无线结缝合技术；主持完成卫生部人类疾病比较医学重点实验室开放课题基金（ZDS200803）项目“促红细胞生成素（EPO）对急性肾损伤后纤维化的影响”，证实 EPO 能减轻小鼠肾缺血再灌注损伤后期肾小管间质纤维化程度，并与肾缺血再灌注损伤后期肾小管间质纤维化的影响与调控 Bcl-2/Bax 的表达有一定相关性；主持完成贵州省长基金（黔省专合字 2007-82 号）项目“PKC beta/theta 在小鼠肾移植中的作用”。此外，本团队跟国内外著名大学也长期保持着联系与合作交流，如派人去德国汉诺威医科大学学习与合作研究，并邀请国外专家来访讲学及指导科研。团队也和华中科技大学医学院有着密切的交流与往来。已有数十篇关于移植免疫及再灌注损伤等方面的文章在国内外权威期刊（如 *Circulation*、*JASN*、*JI*、中华实验外科杂志等）上发表。

容 松

（遵义医学院 肾病中心器官移植实验室，贵州 遵义 563003）

动 物 学 研 究 2012，Oct. 33(5): 433−438 CN 53-1040/Q ISSN 0254-5853
Zoological Research DOI：10.3724/SP.J.1141.2012.05433

广西弄岗穗鹛不同季节的觅食地选择

杨 岗[1], 陆 舟[1], 余辰星[1], 蒋爱伍[2], 蒙渊君[3], 周 放[1,*]

(1. 广西大学 动物科学技术学院, 广西 南宁 530005; 2. 兰州大学 生命科学学院, 甘肃 兰州 730000;
3. 广西弄岗国家级自然保护区管理局 广西 龙州 532400)

摘要：2010 年 7—9 月(雨季)和 2010 年 11 月—2011 年 2 月(旱季), 在广西弄岗国家级自然保护区采用样线法和样方法对弄岗穗鹛 (*Stachyris nonggangensis*) 觅食地选择进行研究。主成分分析表明, 雨季的乔木层因素和落叶及草本层因素、旱季的地形地貌因素以及草本与灌木层因素是其觅食地的主要特征。圆形分布统计分析显示, 雨季和旱季其觅食地多位于中缓坡。与对照样方的差异性检验显示, 弄岗穗鹛雨季偏好乔木盖度低的生境, 旱季则偏好中、下坡位、灌木高度较高且落叶厚度大的生境。两个季节觅食地的比较显示, 其旱季觅食地处于较低海拔, 且多位于中、下坡位; 旱季草本盖度小于雨季, 而落叶盖度和落叶厚度则大于雨季。逻辑斯蒂回归分析表明：弄岗穗鹛雨季觅食地选择以海拔、坡度以及落叶盖度等 3 个变量为综合考量, 而旱季则以坡位、乔木盖度、草本盖度以及落叶厚度等 4 个变量为综合考量。

关键词：弄岗穗鹛; 觅食地选择; 因子分析; 逻辑斯蒂回归分析
中图分类号：Q14; Q915.865 **文献标志码**：A **文章编号**：0254-5853-(2012)05-0433-06

Seasonal feeding site selection of the Nonggang Babbler (*Stachyris nonggangensis*) in Nonggang, Guangxi, China

YANG Gang[1], LU Zhou[1], YU Chen-Xing[1], JIANG Ai-Wu[2], MENG Yuan-Jun[3], ZHOU Fang[1,*]

(1. *College of Animal Science and Technology*, *Guangxi University*, *Nanning* 530005, *China*; 2. *School of Life Sciences*, *Lanzhou University*, *Lanzhou* 730000, *China*; 3. *Nonggang National Nature Reserve of Guangxi province*, *Longzhou* 532400, *China*)

Abstract: We investigated the feeding sites of the Nonggang Babbler (*Stachyris nonggangensis*) during three time periods (July−September, 2010; November−December, 2010; January−February, 2011) in Nonggang National Nature Reserve, Guangxi, China with the line transect method and sampling method. Principal component analysis of the data identified that the feeding sites in the rainy season were dominated by factors consisting of tree layer, the layer of fallen leaves and the herb layer; whereas the feeding sites in the dry season were dominated by factors dependant on terrain, herb layer and shrub layer. The results of a circular distribution analysis showed that the Nonggang Babbler preferred feeding sites with a gentle slope in both the rainy season and dry season. The tests of differences of the variables between used and control plots indicated that with low arbor coverage in the rainy season, whereas with a low slope position, high shrub and thick fallen leaves in the dry season. In comparison with the rainy season, the feeding sites in the dry season tended to be at lower altitude, to have a lower slope position, lower grass coverage, and to be covered with a larger and thicker bed of fallen leaves. A logistic regression analysis suggested that altitude, slope, and shatter cover were the most important factors influencing feeding site selection in the rainy season. Slope position, arbor cover, grass cover, and the thickness of the shatter cover were the most important factors influencing feeding site selection in the dry season.

Key words: Nonggang Babbler (*Stachyris nonggangensis*); Feeding-site selection; Factor analysis; Logistic regression analysis

弄岗穗鹛(*Stachyris nonggangensis*)为画眉科(Timaliidae)鸟类, 是由中国学者发现并命名的鸟类新种(Zhou & Jiang, 2008)。栖息于喀斯特季雨林中, 除繁殖季节(4—6 月)成对外, 其余时间集成小群;

收稿日期：2012-03-12；接受日期：2012-07-11
基金项目：国家自然科学基金(30970381)和广西自然科学基金(2010GXNSFB013044)资助项目
*通信作者(Corresponding author)，E-mail: zhoufang@gxu.edu.cn
第一作者简介：杨岗, 男, 硕士研究生, 研究方向为动物资源保护。E-mail: wild_bird@126.com

主要在森林下层以跳跃方式活动，仅在受到惊扰和转移时作短距离飞行；通过翻动岩石缝隙和地面的落叶，以搜寻蠕虫、昆虫及其幼虫以及软体动物等为食，是典型的森林下层鸟类(Zhou & Jiang, 2008)。由于其分布狭窄，数量稀少，被列为全球近危物种(IUCN, 2010)。

在不同的研究尺度上，物种的丰富度和分布模式会有所不同(Johnson, 1980)，在不同的时间尺度上，动物会选择不同的资源(Wiens, 1986; Miller et al, 1999; Zhang et al, 2003; Yang et al, 2011)，了解动物在不同时间和空间尺度的变化反应，对制定相应的生态研究和监测方案十分重要(Addicott et al, 1987; Kie et al, 2002)。同时，从多个尺度研究并收集栖息地数据资料，在资源管理上也是十分必要的(Boyce et al, 2003)。作为栖息地的一部分，觅食地是动物获取食物资源的重要场所，其质量直接关系到动物的生存和繁衍（Liu et al, 2008）。由于弄岗穗鹛是近几年才发现的新种，因此对于其栖息地选择等情况的了解还很缺乏。弄岗穗鹛的觅食地有哪些特征？在觅食地选择上是否存在季节性差异以及在哪些方面表现差异？了解这些将对制定针对弄岗穗鹛的有效保护措施提供科学依据。

1 研究地区与方法

1.1 研究地区

广西弄岗国家级自然保护区位于E106°42′28″～107°04′54″，N22°13′56″～22°39′09″，地处中国南部，地跨广西崇左市的龙州和宁明两县，由陇呼、弄岗、陇山相互隔离的三大片林地组成，总面积10 077.5 hm^2。保护区属典型喀斯特地貌，地貌类型为峰丛深切园洼地槽谷地形，有峰丛洼地和峰丛谷地，境内海拔一般为300～600 m。气候属北热带季风气候，年均气温22 ℃，年降雨量1 150～1550 mm，干、湿季节区分明显，80%的降雨量集中在5—9月。保护区内由于岩溶发育，渗漏通道良好，兼之地形有利于径流排泄，所以地表水系极不发育，只有一些季节性小溪，以及雨季谷地中一些短暂的壅水或池塘。保护区的森林植被保存较好，森林覆盖率>90%，主要属于北热带喀斯特季节性雨林(Deng et al, 1988)。本研究选择在弄岗穗鹛种群数量较大的弄岗保护站(弄岗片区)进行。

1.2 研究方法

1.2.1 数据收集 2010年6—9月(雨季)和2010年11月—2011年2月(旱季)，在弄岗保护站沿巡山护林路线设置8条样线，每条样线2～3 km，调查时间7:00—18:00，每日调查1～2条样线，每个季节每条样线重复3次以上。使用GPS对弄岗穗鹛的觅食点进行定位，成群觅食时，则以群体觅食活动集中的区域定位。以GPS测定的方位为中心，设置5 m×5 m的大样方作为利用样方，根据保护区的生境特点，测量样方参数包括：海拔、坡向、坡度、坡位、乔木均高、乔木盖度、灌丛均高、灌丛盖度、草本均高、草本盖度、藤本多度、落叶盖度、落叶厚度以及裸岩比例等14个参数。海拔通过GPS测量；坡向和坡度用指北针测量；坡位指取食点所在山坡的位置，分为下、,中、上坡位，取值分别为1、2、3 (Xu et al, 2002)；乔木和灌木的高度根据已知高度的参照物进行目测；乔木、灌木和草本的盖度，落叶盖度以及裸岩比例通过目测估计；藤本多度根据目测样方中藤本植物的数量，分为少、中、多，取值分别为1、2、3。在大样方的中心和四角设置1 m×1 m的小样方共5个，在小样方中用卷尺测量草本的高度，取其均值做为大样方草本的平均高度，在小样方中各取3个点用卷尺测量落叶厚度，求均值获得大样方落叶厚度。沿样线，每行进约200 m，无弄岗穗鹛觅食活动的地方设置一个5 m×5 m的样方，作为对照样方。两个季节各设置利用样方35个，对照样方50个，在对照样方中测量与利用样方相同的参数。

1.2.2 数据处理 用圆形分布统计方法(circular distribution)分析坡向和坡度(Zar, 2010)，采用Rayleigh's test分析利用样方坡向和坡度是否存在集中趋势，若存在，则采用求平均角期望区间的方法得出弄岗穗鹛对坡向和坡度的选择性。采用Watson's U^2 test分析坡向和坡度在利用样方和对照样方之间以及雨、旱季之间是否存在差异。分析其余参数的差异性时，先用Kolmogorov-Smirnov test检验数据是否符合正态分布，当数据符合正态分布时，使用独立样本的*t*-test，当数据不符合正态分布时，使用Mann-Whitney *U*-test。对弄岗穗鹛觅食地特征进行因子分析(factor analysis)，采用提取主成分(principal components)法，通过相等最大值(equamax)法获得旋转后的因子负荷矩阵，其余选项均用默认值。对各参数进行Spearman相关分析，如果参数间相关系数的绝对值 $r\leq0.5$ 时，视为不相关，参数予以保留；若参数相关，用单变量的逻辑

斯蒂回归检验参数的重要性，保留具有较高对数似然比值的参数，但要兼顾其生物学意义(Boyce & McDonald, 1999)，保留的参数用二元逻辑斯蒂回归的向前逐步法分析，筛选影响觅食地选择的生态因子，有关选项使用默认值。数据采用 mean±*SD* 表示，数据处理均在 Microsoft Excel 2003 和 SPSS 17.0 for Windows 统计软件上完成。

2　结　果

2.1　觅食地特征

弄岗穗鹛雨季、旱季觅食地利用样方各变量比较见表 1，觅食地利用样方 14 个变量的主成分分析结果见表 2。

雨季有 6 个主成分的特征值>1，累计贡献率达 76.594%。其中，第一个主成分中乔木盖度和灌木均高的因子负荷系数绝对值较大，第三个主成分中海拔和乔木均高的因子负荷系数绝对值较大，这两个主成分反映上层植被和海拔条件；第二个主成分的落叶及草本盖度起主要影响作用，与弄岗穗鹛的觅食活动有关；第四个主成分的藤本多度、草本均高和灌木盖度起主要影响作用，反映弄岗穗鹛觅食地中、下层植被条件；裸岩比例和落叶厚度，坡向和坡度分别在第五个主成分和第六个主成分中起主要影响作用，反映地形地貌条件。

旱季有 6 个主成分的特征值>1，累计贡献率达 72.499%。坡位和海拔在旱季第一个主成分中起主要作用，裸岩比例和坡度在第二个主成分中起主要影响作用，反映觅食地的地形地貌条件；草本均高和灌木盖度，藤本多度和乔木均高，乔木盖度和草本盖度分别在第三、第四和第五个主成分中起主要影响作用，反映觅食地的植被条件；坡向和落叶盖度在第六个主成分中起主要影响作用，反映落叶层条件。

2.2　觅食地选择

从表 3 可以看出，雨季、旱季弄岗穗鹛觅食坡向无明显的集中趋势；在坡度上，雨季活动于 7°～27°，旱季活动于 4°～24°的缓坡生境。与对照样方相比，雨季弄岗穗鹛觅食生境乔木盖度显著<对照样方(表 1)；旱季觅食地坡位、灌木均高、落叶厚度与对照样方相比存在显著或极显著差异，弄岗穗鹛偏好中、下坡位，觅食生境灌木均高、落叶厚度>对照样方。

由于两个季节利用样方和对照样方存在显著差异的参数较少，因此两个季节均将所有参数进行

表 1　弄岗穗鹛雨季、旱季觅食地利用样方和对照样方、利用样方之间的变量比较(mean±*SD*)

Tab. 1　Variable comparisons between used plots and control plots, and comparisons between of used plots in the rainy and dry seasons of the Nonggang Babbler (mean±*SD*)

变量 Variables	雨季 Rainy season				旱季 Dry season				利用样方：雨季 vs 旱季 Rainy season used plots vs Dry season used plots	
	利用样方 Used plots	对照样方 Control plots	*t/U*- test		利用样方 Used plots	对照样方 Control plots	*t/U* -test		*t/U*- test	
			t/U	*df*			*t/U*	*df*	*t/U*	*df*
AL (m)	278.77±79.91	241.08±55.71	−1.643		230.80±65.54	237.68±87.08	*−0.395*	83	−2.479*	
SP	1.83±0.51	1.78±0.76	−0.607		1.31±0.58	1.82±0.60	−3.894**		−3.925**	
HA (m)	9.35±2.62	9.08±2.11	−0.162		9.87±2.68	9.63±3.08	−1.089		−1.353	
CA (%)	63.60±14.54	71.22±13.97	−2.493*		63.60±11.94	59.68±15.02	−1.103		−0.201	
HS (m)	1.08±0.33	1.20±0.53	−1.011		1.30±0.44	1.11±0.45	−2.137*		−2.204*	
CSHR (%)	28.20±16.20	33.66±19.24	−1.036		26.77±16.62	27.38±19.49	−0.161		−0.495	
HG (m)	0.46±0.19	0.42±0.23	−1.372		0.40±0.18	0.39±0.17	−0.479		−1.178	
CG (%)	27.69±15.27	32.04±21.02	*−1.047*	83	18.40±12.28	23.67±21.12	−0.336		*2.803***	68
LA	1.34±0.68	1.44±0.71	−0.814		1.60±0.88	1.40±0.70	−0.903		−1.215	
CSHA (%)	35.34±17.40	45.14±23.01	−1.774		47.94±22.05	45.96±23.64	−0.425		−2.420*	
TS (cm)	3.59±0.80	3.52±0.95	−1.173		6.08±1.36	4.39±1.35	−5.044**		−6.145**	
PB (%)	37.11±20.04	31.56±27.70	−1.791		36.51±20.89	29.50±23.31	−1.749		*0.123*	68

AL: 海拔 Altitude; SP: 坡位 Slope positions; HA: 乔木均高 Height of arbor; CA: 乔木盖度 Cover of arbor; HS:灌木均高 Height of shrub; CSHR: 灌木盖度 Cover of shrub; HG: 草本均高 Height of grasses; CG: 草本盖度 Cover of grasses; LA: 藤本多度 Liana abundance; CSHA: 落叶盖度 Cover of shatter; TS: 落叶厚度 Thickness of shatter; PB: 裸岩比例 Proportion of barerock。

“*t/U*”栏的斜体数据为 *t* 检验值（The italic data in column *t/U* is result of *t*-test）。*: $P<0.05$;　**: $P<0.01$。

表 2 弄岗穗鹛雨季、旱季觅食地变量的主成分分析结果

Tab. 2 Principal component analysis of variable results for used plots of the Nonggang Babbler in the rainy and dry seasons

变量 Variables	主成分 Component											
	雨季 Rainy season						旱季 Dry season					
	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
AL	0.090	–0.037	**0.917**	0.025	–0.114	0.046	**0.735**	–0.098	0.203	0.237	–0.280	–0.068
AS	0.085	–0.155	0.110	–0.014	0.135	**0.855**	0.000	–0.036	–0.018	–0.191	0.340	**0.751**
SP	–0.541	0.090	0.441	0.345	–0.311	0.025	**0.895**	0.100	–0.205	0.128	–0.074	0.104
SL	0.296	–0.384	0.186	0.189	0.210	**–0.618**	0.274	**0.779**	–0.147	0.197	0.156	–0.211
HA	–0.254	0.257	**0.770**	0.159	0.286	–0.091	0.129	0.166	0.303	**0.650**	–0.250	0.206
CA	**0.826**	0.093	0.112	0.084	–0.187	–0.298	–0.156	0.250	–0.075	0.277	**0.763**	0.046
HS	**0.745**	–0.190	–0.199	0.168	–0.047	0.281	–0.572	–0.235	–0.401	0.270	0.178	–0.324
CSHR	0.341	0.358	–0.252	**–0.639**	–0.025	0.230	0.300	–0.373	**–0.661**	0.159	0.146	–0.040
HG	0.032	0.322	0.162	**0.669**	0.107	–0.340	0.164	–0.179	**0.810**	0.090	0.179	0.028
CG	–0.300	**0.785**	0.085	0.239	–0.248	–0.091	–0.104	–0.077	0.166	–0.307	**0.617**	–0.017
LA	0.291	0.148	–0.025	**0.794**	–0.137	0.124	–0.075	0.086	0.193	**–0.679**	–0.042	0.159
CSHA	–0.130	**–0.830**	–0.110	–0.045	–0.261	0.016	–0.097	–0.072	–0.069	–0.220	0.358	**–0.681**
TS	–0.110	0.215	0.083	–0.102	**0.680**	–0.024	0.422	–0.437	0.313	0.485	0.176	0.267
PB	0.006	–0.151	–0.064	0.057	**0.870**	0.065	–0.078	**0.854**	0.160	–0.133	0.027	0.252
贡献率(%) Proportion of Variance	14.417	13.717	13.206	12.69	11.928	10.636	15.078	13.451	11.786	11.502	10.682	10.000
累计贡献率(%) Cumulative proportion	14.417	28.134	41.34	54.03	65.958	76.594	15.078	28.528	40.315	51.817	62.499	72.499

AS: 坡向 Aspects: SL: 坡度 Slope。其余英文缩写同表 1 (The rest of the abbreviations are the same as in Tab. 1)。

表 3 弄岗穗鹛雨季、旱季对坡向和坡位的选择

Tab. 3 Aspect and slope choice of the Nonggang Babbler in the rainy season and dry seasons

变量 Variables	季节 Season	利用样方 Used plots				利用样方 vs 对照样方 Used plots vs Control plots	
		Rayleigh's test (Z)	P	平均角 Mean angle($\bar{a}$)	平均角 95%可置信区间 The 95% confidence interval	Watson's U^2 test (U^2)	P
坡向 Aspects	雨季 Rainy season	0.130	>0.05	—	—	0.069	>0.05
	旱季 Dry season	0.322	>0.05	—	—	0.037	>0.05
坡度 Slope	雨季 Rainy season	33.736	<0.01	17°	7～27°	0.098	>0.05
	旱季 Dry season	33.575	<0.01	14°	4～24°	0.081	>0.05

$Z_{0.05,35}$=2.975, $Z_{0.01,35}$=4.521; $U^2_{0.05,35,50}$=0.187.

Spearman 相关检验，结果显示雨季的草本盖度和落叶盖度，旱季的海拔和坡位的相关系数>0.5，经单变量逻辑斯蒂回归检验，雨季的落叶盖度，旱季的坡位保留，分别与其他参数一起进行逻辑斯蒂回归分析，结果显示(表 4)雨季海拔、坡度及落叶盖度这 3 个变量进入模型，其区分利用样方和对照样方的判别率达到 75.3%。旱季坡位、乔木盖度、草本盖度及落叶厚度这 4 个变量进入模型，其区分利用样方和对照样方的判别率达到 83.5%。

两个季节觅食地坡向的差异性不显著($U^2_{35,35}$=0.043<0.186，P>0.05)，坡度的差异性也不显著($U^2_{35,35}$=0.139<0.186，P>0.05)，觅食海拔和坡位旱季较雨季时低，旱季觅食地灌木高度，落叶盖度和落叶厚度>雨季，草本盖度<雨季 (表 1)。

表 4　弄岗穗鹛雨季、旱季觅食地选择的逻辑斯蒂回归分析结果

Tab. 4　Logistic regression analysis results for feeding site selection of the Nonggang Babbler in the rainy and dry seasons

季节 Season	变量 Variables	回归系数 Coefficient(B)	标准误 *SE*	Wald 统计量 Wald statistics	显著性 Sig.
雨季 Rainy season	海拔 AL	–0.014	0.005	8.695	0.003
	坡度 SL	0.072	0.025	8.432	0.004
	落叶盖度 CS	0.031	0.013	5.819	0.016
	常数 Constant	1.230	1.108	1.232	0.267
旱季 Dry season	坡位 SP	2.602	0.681	14.578	0.000
	乔木盖度 CA	–0.048	0.024	3.858	0.050
	草本盖度 CG	0.046	0.022	4.380	0.036
	落叶厚度 TS	–1.401	0.339	17.053	0.000
	常数 Constant	5.575	2.426	5.282	0.022

3　讨　论

3.1　觅食地特征与选择

雨季弄岗穗鹛觅食生境乔木盖度在主成分分析的第一个主成分中贡献最大(表 2), 利用样方乔木盖度显著<对照样方(表 1)。弄岗穗鹛选择盖度低的生境, 可能与雨季时森林内部潮湿闷热有关, 它们偏向选择空旷透风的环境。第二个主成分的落叶盖度和草本盖度贡献较大, 这 2 个变量直接与其觅食有关。弄岗穗鹛主要在地表和岩石上翻开落叶觅食, 草本层茂密, 盖度高, 将影响其活动, 早晨草本植物、灌丛上有露水, 它们觅食一段时间后会到裸露的岩石或树枝上理羽, 下层植被茂密时增大了其羽毛接触露水的机率, 这也是其选择较低的下层植被盖度的原因之一。

旱季弄岗穗鹛觅食地分析中坡位和海拔, 裸岩比例和坡度分别在第一和第二个主成分中贡献较大, 反映弄岗穗鹛觅食地的地形地貌特征, 即其多觅食于较低海拔的中、下坡位, 且有一定裸岩比例的缓坡生境。旱季林区内干燥, 特别是 1、2 月份时, 有的区域土壤表层干结, 一些草本植物因干旱而枯萎, 与对照样方相比, 弄岗穗鹛选择落叶较厚的区域觅食, 较厚的落叶层, 保水性较好, 藏于落叶土壤层内的无脊椎动物更为丰富, 其选择中、下坡位, 可能也是因为中、下坡位相对湿润, 食物相对丰富。

觅食样方与对照样方相比, 雨季仅乔木盖度 1 个变量, 旱季仅坡位、灌木均高和落叶厚度 3 个变量存在显著差异, 可推测适宜弄岗穗鹛觅食的生境较多。觅食样方和对照样方的逻辑斯蒂回归分析表明, 雨季有 3 个变量进入模型(表 4), 其区分利用样方和对照样方的判别率达到 75.3%, 旱季有 4 个变量进入模型, 其区分利用样方和对照样方的判别率达到 83.5%, 因此推测弄岗穗鹛雨季选择觅食地是对海拔、坡度和落叶盖度综合考量的结果, 旱季觅食地选择是对坡位、乔木盖度、草本盖度和落叶厚度的综合考量。

3.2　觅食地季节变化

两个季节觅食地的草本层和落叶层变量有较大差异, 这与植被的季相变化有关, 旱季一些草本植物凋零枯萎, 草本盖度较雨季时小; 落叶增多, 落叶盖度和落叶厚度则明显>雨季。

有调查发现, 多种画眉科鸟类冬季存在不同程度垂直迁移现象(Fu et al, 2011), 我们的调查显示旱季弄岗穗鹛的活动海拔高度显著<雨季, 据此可推测其为有一定垂直迁移行为的鸟类。调查过程中发现, 白喉扇尾鹟(*Rhipidura albicollis*)也有垂直迁移现象, 旱季时白喉扇尾鹟更多的出现在海拔相对低的森林中, 而雨季很少观察其到低海拔区域活动。黑颈长尾雉(*Syrmaticus humiae*)的研究指出, 其季节性垂直迁移与温度选择有关(Li et al, 2010), 在弄岗保护区, 旱季较高海拔的地方更为干燥, 食物也相对匮乏, 低海拔区域落叶土壤层相对湿润, 可获得食物更多, 弄岗穗鹛的垂直迁移可能与食物因素有关。

喀斯特森林旱季、雨季的湿度变化较大, 根据野外观察, 弄岗穗鹛在觅食地选择上与湿度有一定关系, 雨季多选择在相对干燥, 土壤层粘度较小的生境中觅食, 较少在湿度大, 土壤粘度高的生境觅食, 可能是因为在这样的环境中羽毛容易粘湿弄脏,

其需要花费更多的时间和能量在理羽和清洁上。旱季时，林区内干燥，其更多在落叶层湿度较大的生境中觅食，虽然没有专门调查觅食地的食物丰富度，但旱季对弄岗穗鹛觅食后的落叶层翻动，发现落叶层比较湿润，土壤动物较多，而非觅食生境的落叶土壤层干燥，食物较少。

3.3 觅食地选择策略

一些研究者认为，动物栖息地选择是由取食收益决定的(Storch, 1993; Langvatn & Hanley, 1993)；也有研究者指出捕食风险对动物栖息地选择的影响(Ferguson et al., 1988)。弄岗穗鹛主要选择林下植被稀疏，林下空旷，且坡度平缓的生境，据观察，它们时常在小块区域内集小群连续觅食超过两个小时，其翻动枯叶所发出的“沙，沙”声，在较远处即能听见。其不甚畏人，保持安静时通常能在距离 5 m 左右进行观察，但受到惊扰时，群体会快速往密林处转移，觅食间隙，弄岗穗鹛会到灌丛盖度大的隐蔽场所歇息，可推测，弄岗穗鹛觅食时以获取食物为优先考虑，歇息时则回避风险，以安全性为优先选择。有护林员曾观察到黄腹鼬(*Mustela kathiah*)扑食弄岗穗鹛，笔者也曾观察到一只黄腹鼬在弄岗穗鹛觅食区域附近活动，有时离其 1 m 时，弄岗穗鹛才躲闪，但群体并没有明显逃离躲避，也没有发出警戒声，黄腹鼬伴随弄岗穗鹛觅食，可能是为了抢夺弄岗穗鹛翻出的食物，从而减少觅食投入，也可能是伺机扑食弄岗穗鹛，然而弄岗穗鹛却没有表现出警戒行为；野外观察还发现赤腹松鼠(*Callosciurus flavimanus*)有时会在鸟类混群活动的范围及周边活动，曾观察到一只赤腹松鼠伴随一只绿嘴地鹃(*Phaenicophaeus tristis*)达 2~3 min，哺乳动物与鸟类之间的关系有待进一步研究。

致谢：野外工作得到广西弄岗国家级自然保护区全体工作人员的支持和帮助,在此表示感谢。

参考文献：

Addicott JF, Aho JM, Antolin MF, Padilla DK, Richardson JS, Soluk DA. 1987. Ecological neighborhoods: Scaling environmental patterns [J]. *Oikos,* **49**(3): 340-346.

Boyce MS, McDonald LL. 1999. Relating populations to habitats using resource selection functions [J]. *Trends Ecol Evol,* **14**(7): 268-272.

Boyce MS, Mao JS, Merrill EH, Fortin D, Turner MG, Fryxell J, Turchin P. 2003. Scale and heterogeneity in habitat selection by elk in Yellowstone National Park [J]. *Ecoscience,* **10**(4): 421-431.

Deng ZQ, Hu CG, Li KY, Su ZM, Zhao TL, Huang QC. 1988. Report on comprehensive survey of Nonggang Reserve, Guangxi [J]. *Guihaia*, (Additamentum 1): 1-214. [邓自强, 胡长庚, 李克因, 苏宗明, 赵天林, 黄庆昌. 1988. 广西弄岗自然保护区综合考察报告. 广西植物, (增刊一): 1-214.]

Ferguson SH, Bergerud AT, Ferguson R. 1988. Predation risk and habitat selection in the persistence of a remnant caribou population [J]. *Oecologia,* **76**(2): 236-245.

Fu YQ, Zhang ZW, Chen BP, Ling ZW. 2011. Winter Habitat Characteristics of Red-winged Laughing thrush at Laojunshan National Nature Reserve in China [J]. *Chn J Zool,* **46**(5): 48-54. [付义强, 张正旺, 陈本平, 凌征文. 2011. 四川老君山自然保护区红翅噪鹛冬季栖息地特征. 动物学杂志, **46**(5): 48-54.]

IUCN (International Union for Conservation of Nature and Natural Resources). 2010. IUCN Red List of Threatened Species [EB/OL]. http://www.iucnredlist.org.

Johnson DH. 1980. The comparison of usage and availability measurements for evaluating resource preference [J]. *Ecology,* **61**(1): 65-71.

Kie JG, Bowyer RT, Nicholson MC, Boroski BB, Loft ER. 2002. Landscape heterogeneity at differing scales: effects on spatial distribution of mule deer [J]. *Ecology,* **83**(2): 530-544.

Langvatn R, Hanley TA. 1993. Feeding-patch choice by red deer in relation to foraging efficiency [J]. *Oecologia,* **95**(2): 164-170.

Li W, Zhou W, Liu Z, Li N. 2010. Habitat selection change of Mrs. Hume Pheasant (*Syrmaticus humiae*) in Dazhongshan during the year [J]. *Zool Res,* **31**(5): 499-508. [李伟. 周伟, 刘钊, 李宁. 2010. 云南大中山黑颈长尾雉栖息地选择周年变化. 动物学研究, **31**(5): 499-508.]

Liu Z, Zhou W, Zhang RG, Xie YC, Huang QW, Wen YY. 2008. Foraging sites selection of green peafowl (*Pavo muticus imperator*) in different seasons in Shiyangjiang Valley of upper Yuanjiang drainage, Yunnan [J]. *Biod Sci,* **16**(6): 539-546. [刘钊, 周伟, 张仁功, 谢以昌, 黄庆文, 文云燕. 2008. 云南元江上游石羊江河谷绿孔雀不同季节觅食地选择. 生物多样性, **16**(6): 539-546.]

Miller DA, Hurst GA, Leopold BD. 1999. Habitat use of eastern wild turkeys in central Mississippi [J]. *J Wild Manage,* **63**(1): 210-222.

Storch I. 1993. Habitat selection by capercaillie in summer and autumn: is bilberry important? [J]. *Oecologia,* **95**(2): 257-265.

Wiens JA. 1986. Spatial scale and temporal variation in studies of shrub steppe birds [M] // Diamond J, Case T J. Community Ecology. New York: Harper & Row, 154-172.

Xu JL, Zhang XH, Zhang ZW, Zheng GM. 2002. Brood habitat characteristics of Reeve's pheasant (Syrmaticus reevesii) in Dongzhai national nature reserve [J]. *Zool Res,* **23**(6): 471-476. [徐基良, 张晓辉, 张正旺, 郑光美. 2002. 白冠长尾雉育雏期的栖息地选择. 动物学研究, **23**(6): 471-476.]

Yang G, Pan HP, Xu L, Zhou F, Huang JX. 2011. Winter feeding sites selection of White-browed Hill Partridge [J]. *Zool Res,* **32**(5): 556-560. [杨岗, 潘红平, 许亮, 周放, 黄家喜. 2011. 白眉山鹧鸪冬季觅食地选择. 动物学研究, **32**(5): 556-560.]

Zar JH. 2010. Biostatistical Analysis. 5th Edition. [M]. New Jersey, USA: Prentice Hall, 605-668.

Zhang GG, Zhang ZW, Zheng GM, Li XQ, Li JF, Huang L. 2003. Spatial pattern and habitat selection of brown eared pheasant in Wulushan Nature Reserve, Shanxi Province [J]. *Biod Sci,* **11**(4): 303-308. [张国钢, 张正旺, 郑光美, 李晓强, 李俊峰, 黄雷. 2003. 山西五鹿山褐马鸡不同季节的空间分布与栖息地选择研究. 生物多样性, **11**(4): 303-308.]

Zhou F, Jiang AW. 2008. A new species of Babbler (Timaliidae: *Stachyris*) from the Sino-Vietnamese Border Region of China [J]. *Auk,* **125**(2): 420-424.

动 物 学 研 究 2012，Oct. 33(5): 439−446 CN 53-1040/Q ISSN 0254-5853
Zoological Research DOI：10.3724/SP.J.1141.2012.05439

千岛湖两栖爬行类动物群落结构嵌套分析

王 熙，王彦平，丁 平*

(浙江大学 生命科学学院，杭州 310058)

摘要：生境片段化是导致生物多样性降低的主要原因之一。该文采用样线法对千岛湖 23 个岛屿的两栖爬行类进行了调查，并结合植物种类调查数据和 GIS 技术提取的栖息地景观参数，使用“BINMATNEST”软件和 Spearman 相关性分析等方法，对这些岛屿上的两栖爬行类群落的分布格局及其影响因素进行分析。结果表明，千岛湖两栖爬行类群落整体上呈现嵌套分布格局；嵌套格局与岛屿面积和生境类型相关显著。因此，在制定千岛湖地区两栖爬行动物保护措施时，应优先考虑面积较大和生境类型多的岛屿。

关键词：生境片段化；两栖动物；爬行动物；嵌套结构；保护策略；千岛湖
中图分类号：Q14; Q915.863; Q915.864 **文献标志码**：A **文章编号**：0254-5853-(2012)05-0439-08

Nested species subsets of amphibians and reptiles in Thousand Island Lake

WANG Xi, WANG Yan-Ping, DING Ping*

(*College of Life Sciences*, *Zhejiang University*, *Hangzhou* 310058, *China*)

Abstract: Habitat fragmentation is a main cause for the loss of biological diversity. Combining line-transect methods to survey the amphibians and reptiles on 23 islands on Thousand Island Lake in Zhejiang province, along with survey data on nearby plant species and habitat variables collected by GIS, we used the “BINMATNEST (binary matrix nestedness temperature calculator)” software and the Spearman rank correlation to examine whether amphibians and reptiles followed nested subsets and their influencing factors. The results showed that amphibians and reptiles were significantly nested, and that the island area and habitat type were significantly associated with their nested ranks. Therefore, to effectively protect amphibians and reptiles in the Thousand Islands Lake area we should pay prior attention to islands with larger areas and more habitat types.

Key words: Habitat fragmentation; Amphibians; Reptiles; Nestedness; Conservation strategies; Thousand Island Lake

生境片段化是导致生物多样性丧失的主要原因之一(Burkey, 1995; Vitousek et al, 1997; Laurance et al, 2002; Mac Garigal & Cushman, 2002)。生境片段化是指在人为活动和自然干扰下大块连续分布的自然生境被其他非适宜生境分隔成许多面积较小的生境斑块的过程。在这个过程中，不同物种因对生境片段化敏感程度存在差异而不同程度地占据这些栖息地斑块，进而在一定程度上形成嵌套格局(nestedness) (Zhang et al, 2008)。嵌套格局的概念最早由 Darlington(1957)提出，指在一个岛屿生态系统中，小岛屿中出现的物种多数也会出现在物种相对丰富的大岛屿中的分布模式。随后，Patterson & Atmar (1986)首次系统地提出了在群落水平构建矩阵进行嵌套分析的方法。从此，嵌套格局理论在群落生态学领域被广泛应用于各种栖息地斑块类型中的群落物种组成和分布格局的研究(Dobson & Pacala, 1992; Honnay et al, 1999; Fleishman et al, 2002; Greve et al, 2005)。现在，嵌套结构已被证明是岛屿群落组成的普遍结构。但是由于形成嵌套格局的机制在不同系统和不同类群中有较大差异（Wang et al, 2010)，根据已有研究还不能清楚地了解片段化栖息地中生物群落嵌套格局形成过程的

收稿日期：2012-02-17；接受日期：2012-05-10
基金项目：国家自然科学基金资助项目(31100394, 31170397, 30870315)
*通信作者(Corresponding author)，E-mail: dingping@zju.edu.cn

全貌(Wright et al, 1998)。因此, 对于不同栖息地类型中不同类群的嵌套格局还需要进一步的分析和研究。

目前已有很多机制用来解释嵌套格局的形成原因 (Schoener & Schoener, 1983; Blake, 1991; Baber et al, 2004; Higgins et al, 2006), 主要有4种假说在当前占主导地位(Wright et al, 1998; Chen & Wang, 2004)：(1) 选择性迁移假说(the selective colonization hypothesis)：由于物种扩散能力的差异, 扩散能力强或弱的多数物种都可占领大岛屿; 而扩散能力强的少数物种占领小岛屿,从而形成嵌套格局 (Bird & Boecklen, 1998; Cook & Quinn, 1995; Conroy et al, 1999; Loo et al, 2002; Mac Nally et al, 2002)。(2) 选择性灭绝假说(the selective extinction hypothesis)：岛屿面积大小制约物种分布, 要求较大的最小面积的物种,或具有较小种群的物种, 可能会从不同面积的岛屿生境中首先灭绝, 从而形成嵌套格局(Patterson & Atmar, 1986; Bolger et al, 1991; Cutler, 1991; Lomolino, 1996)。 (3) 生境嵌套假说(the habitat nestedneass hypothesis)：物种分布与生境密切相关,即嵌套格局是岛屿生境结构呈现嵌套格局的结果(Blake, 1991; Calmé & Desrochers, 1999; Honnay et al, 1999; Ficetola & Bernardi, 2004)。 (4) 被动抽样假说(the passive sampling hypothesis)：不同生境中, 物种多度存在较大差异,因此在抽取样本时,多度高的物种被抽中的概率大; 在不同取样面积下, 数量丰富的物种在小面积中出现的概率和在大面积的抽样中出现的概率都大,反之亦然。因此,不同取样面积的一系列物种组合自然就形成了嵌套结构(Cutler, 1994; Lomolino, 1996; Andrén, 1994; Nielsen & Bascompte, 2007)。4种假说中, 除“被动抽样”与物种间多度差异和抽样强度有关(Schouten et al, 2007)外, 其他三种假说与栖息地特征和物种生活史特征等因素有关(Wright et al, 1998; Fleishman et al, 2002; Schouten et al, 2007)。

在自然生态系统中, 两栖爬行类占有重要地位。研究表明, 全球两栖爬行类正以超过自然灭绝的高速率灭绝(Stuart et al, 2004; Whitfield et al, 2007), 这与生境丧失和片段化有直接关系(Chen & Li, 1990; Pan et al, 2002)。两栖爬行类动物群落结构的变化, 反映了群落内部关系及群落与其外界环境的联系。由于两栖动物和爬行动物在不同岛屿之间的迁移能力较弱(Mac Nally & Brown, 2001), 物种交流少, 因此是研究岛屿动物群落组成的良好类群。

千岛湖独特的自然景观与已形成 50 多年的岛屿化栖息地为研究栖息地片段化提供了重要实验平台。本研究以千岛湖人工湖泊岛屿为研究点, 以两栖爬行类为研究对象, 分析和验证千岛湖岛屿两栖爬行类群落的分布是否符合嵌套格局, 以及面积、隔离度、植物物种丰富度和生境类型等岛屿景观参数对嵌套格局的影响。从而探讨影响两栖爬行类群落分布格局的生态因素, 为保护片段化栖息地内两栖爬行类的生物多样性提供理论依据和策略。

1 研究地概况与研究方法

1.1 研究地概况

千岛湖地处浙江省西部, 位于浙江省淳安县境内(N29°22～29°50′, E118°34′～119°15′)。东西长 60 km, 南北宽 50 km, 景区总面积 982 km^2, 其中湖区面积 573 km^2。千岛湖是 1959 年 9 月建造的新安江水力发电站, 因拦坝蓄水使海拔 108 m 以下皆沦为水域而形成的人工湖水库, 库容量为 1.784×10^{10} m^3, 未被淹没的山峰形成 1 078 个面积>0.25 hm^2 的岛屿。千岛湖地处亚热带季风气候区的北缘, 属亚热带季风气候区。湖中岛屿植被以天然次生马尾松(*Pinus massoniana*)林为主。年平均气温为 17 ℃, 气温年较差和日较差小, 年平均降水量为 1 430 mm (Wang et al, 2009)。

1.2 岛屿设置

2009—2011 年夏季, 在千岛湖选取 23 个人为干扰少的岛屿作为取样研究区域(图 1)。所选岛屿面积从<1 ～>1 000 hm^2, 距陆地最近距离(隔离度)从 640.53～2849.99 m。依据岛屿面积从大到小的顺序依次标记为 1～23 号。岛屿方位与景观参数分别见图 1、表 1。

1.3 两栖爬行类种类调查

2009 年、2010 年和 2011 年的 7—8 月, 采用样线法调查两栖爬行类。对面积稍大的 1～5 号岛, 采用“Z”形多条路线, 覆盖全岛进行调查; 对 6～8 号中型岛, 沿岛屿嵴部设置样线, 贯通全岛进行调查; 对面积较小的 9～23 号岛, 覆盖全岛面积进行调查。

调查期间, 考虑到两栖爬行类动物的习性, 每天 13:00—17:00 以～1.5 km/h 的速度, 在 2～5 m 范围内调查蜥蜴类和蛇类动物(Wang et al, 2009);

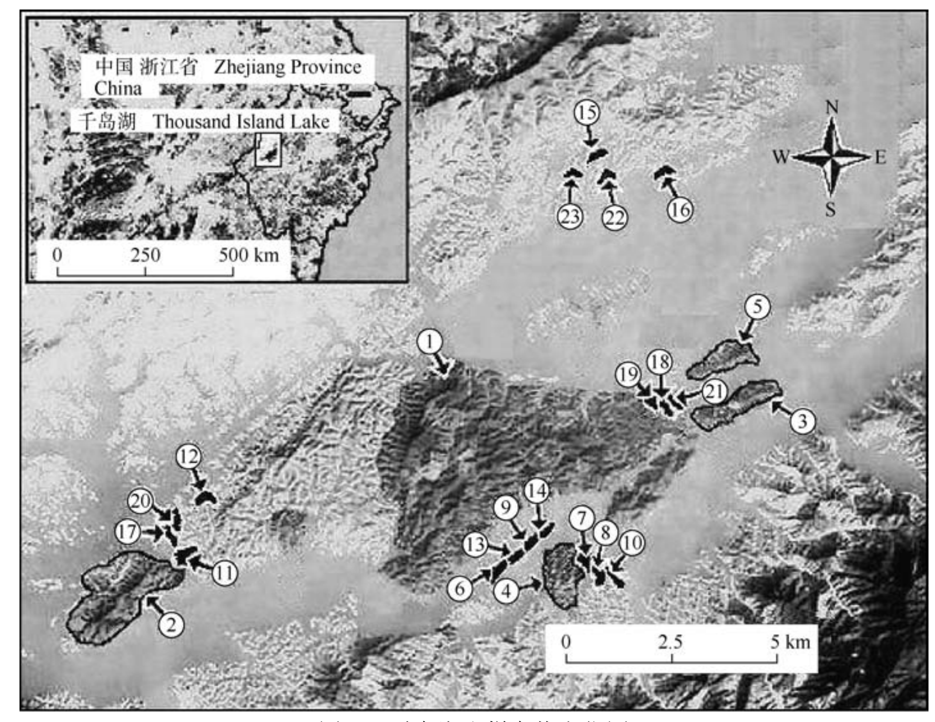


图 1　千岛湖取样岛屿方位图

Fig. 1　Locations of the sampled islands on Thousand Island Lake

①、②、③…为各取样岛屿序号（①、②、③…are the numbers of the sampled islands）。

表 1　取样岛屿的景观参数

Tab. 1　Characteristics of 23 islands sampled for the presence of frogs, snakes and lizards in Thousand Island Lake, China

岛屿编号 Island code	岛屿面积 Island area (hm^2)	隔离度 Isolation (m)	生境类型 Number of habitat types (*n*)	植物丰富度 Plant richness (*n*)	嵌套序列 Nested matrix rank		
					蛙类 Frogs	蛇类 Snakes	蜥蜴类 Lizards
1	1289.23	897.41	7	198	1	1	1
2	143.19	1415.09	6	99	2	3	2
3	55.08	953.95	5	59	22	2	3
4	46.37	729.8	5	51	7	5	5
5	32.29	1936.95	5	57	8	4	4
6	2.9	1785.3	3	85	3	17	9
7	2.83	1238.14	4	86	4	13	17
8	2.29	973.85	4	65	11	14	7
9	1.74	2293.25	3	100	6	18	14
10	1.54	711.04	3	88	5	10	8
11	1.52	2849.99	3	53	10	6	6
12	1.4	1760.34	3	49	9	11	13
13	1.2	2128.52	3	68	19	7	11
14	1.17	2453.37	3	69	13	20	19
15	1.15	847.12	3	33	12	19	20
16	1.03	1458.81	3	36	15	9	18
17	1.01	2437.85	3	29	20	21	22
18	1.01	2103.85	3	36	16	15	12
19	0.86	2321.51	3	56	18	12	15
20	0.83	2298.5	3	50	21	8	16
21	0.8	2097.52	2	80	17	16	21
22	0.67	1139.87	3	39	14	22	10
23	0.59	640.53	3	42	23	23	23

隔离度为岛屿距最近陆地距离; 蛙类、蛇类、蜥蜴类所在的 23 个岛屿的嵌套序列排序为 BINMATNEST 软件最大化排列矩阵的排序, 分别参照表 2、表 3、表 4。

Isolation is the distance between an island and its nearest land; nested matrix ranks of frogs, lizards and snakes on 23 islands are the ranks of maximum permutation matrix generated by the BINMATNEST software.

18:00—24:00 以～0.7 km/h 的速度在 LED 强聚光灯照明下沿着样线搜索前进，记录距离样线 2～3 m 范围内的蛙类和蛇类(Jaeger, 1994)。每个岛屿重复调查 15 次。

1.4　栖息地特征参数

栖息地特征参数包括岛屿面积、隔离度、生境类型及植物物种丰富度。其中，隔离度反映两栖爬行类从陆地迁入岛屿时需要跨越的最小距离(Adler & Seamon, 1991; Meyer & Kalko, 2008; Wang et al, 2010, 2011)。岛屿面积(hm^2)、隔离度(m)均使用 ArcView 3.2 对千岛湖地区景观地形参数图(1:10000)进行测量。

2007 年 4—11 月间调查 23 个研究岛屿的生境类型和植物种类。将所有生境类型划分成针叶林、阔叶林、针阔混交林、竹林、灌木、杂草和农田 7 个生境类型(Wang et al, 2009)。调查者对岛屿上的植物种类进行直接辨认，对辨认不清的植物采样后对照《浙江种子植物检索鉴定手册》(Zheng, 2005)和《浙江植物志》(Zhang et al, 1986)进行鉴定。各岛屿的生境类型和植物物种数(植物物种丰富度值)详见表 1(Zhang et al, 2008)。

1.5　嵌套分析方法

嵌套分析数据是物种在斑块上的出现情况，分析前先将数据以矩阵形式排列。其中行代表种类，列代表地点(即岛屿)，以“1”或“0”表示物种“出现”或“不出现”。本研究使用 Rodriguez-Girones (2006)提出的 BINMATNEST(binary matrix nestedness temperature calculator)软件基于计算矩阵温度 T 的方法来量化嵌套程度。分析时 BINMATNEST 会自动最大化排列输入的矩阵，并计算出矩阵温度。比较实际矩阵温度和使用 Null modal 产生的随机矩阵(1 000 个)温度，得到两种矩阵温度差异的显著性。矩阵比较中应用 BINMATNEST 提供的 null model 3，该模型根据原矩阵中对应行、列的出现可能性平均值决定单元格的出现可能性，在研究中被证明能够有效控制被动取样对嵌套显著性的影响(Rodriguez-Girones & Santamaria, 2006; Moore & Swihart, 2007)。

序列相关性分析应用 Spearman 来分析嵌套结构的影响因素。近年来该方法在类似的分析中得到广泛地使用(Fernandez-Juricic, 2004; Granado-Loreneioetal, 2007; Schouten et al, 2007)。分析时将矩阵的行和列依据影响因素(如面积、隔离度等)分别排序，然后使用 BINMATNEST 最大化排列后的序列和原始序列进行 Spearman 序列相关性分析。若相关性显著，说明分析因素对嵌套格局的形成有显著影响(Chen & Wang, 2004; Schouten et al, 2007)。各项统计分析计算均在 SPSS13.0 分析软件中进行。

2　结　果

2.1　千岛湖两栖爬行类的嵌套分布格局

调查共记录蛙类 9 种，分属 5 科 8 属；蛇类 11 种，分属 3 科 10 属；蜥蜴类 5 种，分属 2 科 3 属(表 2–4)。BINMATNEST 软件(null model 3)分析结果表明：蛙类、蛇类和蜥蜴类的矩阵温度观测值(T_{obs})均<矩阵温度预测值(T_{exp}) ($P<0.001$)(表 5)，说明三者均表现显著的嵌套格局。

2.2　千岛湖两栖爬行类嵌套格局的影响因素

采用 SPSS13.0 统计软件，以嵌套序列为自变量，面积、隔离度等景观参数为因变量(数据见表 1)进行 Spearman correlation 分析得到如下结果(表 5)。面积、生境类型和植物丰富度对蛙类嵌套格局的形成影响显著($p<0.05$)，隔离度的影响不显著；面积和生境类型对蛇类嵌套格局的形成影响非常显著($P<0.01$)，植物丰富度和隔离度的影响不显著；面积、生境类型和植物丰富度对蜥蜴类嵌套格局形成的影响非常显著 ($P<0.01$)，隔离度的影响不显著。

3　讨　论

3.1　嵌套格局的影响因素

岛屿面积大小对千岛湖两栖爬行类群落嵌套格局的形成有很大影响，这支持选择性灭绝假说。由于岛屿面积大小在一定程度上反映了动物可用于生存的资源量和空间范围，通过对具有不同生存面积需求物种的“过滤”，群落可能在一定程度上发生选择性灭绝(Li et al, 1998)。对于需要较大生存空间范围、生境专属性较高和种群密度较小的物种而言，灭绝的风险更高(Wang et al, 2010)。因此，这些物种在较小面积岛屿上出现的几率比在较大面积岛屿上出现的几率要小。相反，对于那些对面积需求较小的物种在小岛和大岛上均有分布，这样便形成了嵌套格局。此外，由于岛屿的物种分化程度往往很低，尤其是两栖爬行类动物，所以岛屿动物种群通常表现出极度发展或极度萎缩的状态，通常是单一物种数量很大(Halliday & Adler, 2002)。比如

表 2　千岛湖蛙类使用 BINMATNEST 软件产生的最大化排列矩阵

Tab. 2　BINMATNEST maximally packed nested matrix for frogs on 23 islands in Thousand Island Lake

种类 Species	岛屿 Islands																						
	1	2	22	7	8	3	4	11	6	5	10	9	19	13	12	15	20	16	18	21	17	14	23
花臭蛙 *Odorrana schmackeri*	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
中华蟾蜍 *Bufo gargarizans gargarizans*	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
斑腿泛树蛙 *Polypedates megacephalus*	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
饰纹姬蛙 *Microhyla ornata*	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
中国雨蛙 *Hyla chinensis*	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
泽陆蛙 *Fejervarya limnocharis*	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
黑斑蛙 *Pelophylax nigromaculata*	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
金线蛙 *Pelophylax plancyi plancyi*	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
镇海林蛙 *Rana zhenhaiensis*	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

表 3　千岛湖蛇类使用 BINMATNEST 软件产生的最大化排列矩阵

Tab. 3　BINMATNEST maximally packed nested matrix for snakes on 23 islands in Thousand Island Lake

种类 Species	岛屿 Islands																						
	1	3	2	5	4	17	13	14	18	10	6	11	7	20	19	9	21	15	12	8	16	22	23
王锦蛇 *Elaphe carinata*	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0
乌梢蛇 *Zaocys dhumnades*	1	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
银环蛇 *Bungarus multicinctus*	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
虎斑颈槽蛇 *Rhabdophis tigrinus*	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
眼镜蛇 *Naja atra*	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
竹叶青 *Trimeresurus stejnegeri stejnegeri*	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
尖吻蝮 *Deinagkistrodon acutus*	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
翠青蛇 *Cyclophiops major*	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
龟壳花蛇 *Trimeresurus mucrosquamatus*	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
中国小头蛇 *Oligodon chinensis*	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
滑鼠蛇 *Ptyas mucosus*	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

表 4　千岛湖蜥蜴类使用 BINMATNEST 软件产生的最大化排列矩阵

Tab. 4　BINMATNEST maximally packed nested matrix for lizards on the studied islands in Thousand Island Lake

种类 Species	岛屿 Islands																						
	1	2	3	5	4	9	17	7	14	8	6	13	11	19	20	18	22	12	15	16	21	10	23
中国石龙子 *Eumeces chinensis*	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0
北草蜥 *Takydromus septentrionalis*	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
蓝尾石龙子 *Eumeces elegans*	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
宁波滑蜥 *Scincella modestum*	1	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
印度蜓蜥 *Sphenormorphus indicus*	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

表 5 千岛湖 23 个岛屿两栖爬行类嵌套分析结果, 表中给出矩阵温度观测值(T_{obs}), 矩阵温度预测值(T_{exp})和使用零模型 3 得到的随机检验 P 值

Tab. 5 Results of the nested analyses for all amphibians and reptiles on the 23 islands in Thousand Island Lake; showing observed matrix temperatures (T_{obs}), expected nested temperatures (T_{exp}), and Monte Carlo-derived probabilities that the matrix was randomly generated under null model 3

	矩阵温度观测值 T_{obs}	矩阵温度预测值 T_{exp}	显著水平 P	与岛屿特征的秩相关 Rank correlation with island			
				面积 Area	隔离度 DNM	植物丰富度 PSR	生境类型 HT
蛙类 NR	0.23	11.62	<0.001	–0.709**	0.335	–0.487*	–0.720**
蛇类 NR	4.13	23.46	<0.001	–0.654**	–0.083	–0.381	–0.594**
蜥蜴类 NR	8.33	29.35	<0.001	–0.767**	–0.105	–0.443*	–0.781**

NR: 嵌套序列(Nestedness ranking); DNM: 距最近陆地距离(Distance to the nearest mainland); PSR: 植物丰富度(Plant species richness); HT: 生境类型(Habitat type)。* $P<0.05$, ** $P<0.01$ (Spearman rank correlations).

在本研究中花臭蛙在所有调查岛上均有分布, 而且数量众多。

岛屿的生境类型对千岛湖两栖爬行类群落嵌套格局的形成也有很大影响, 这符合生境嵌套结构假说。Wang et al (2009, 2010)的研究表明, 蜥蜴类对生境片段化十分敏感, 同时生境异质性对蜥蜴类的嵌套格局有显著影响。但是多数物种偏爱某一类型的生境, 而生境类型在岛屿间的分布并不是随机的, 而是呈现一种嵌套的分布, 生境的嵌套分布最终将导致物种分布的嵌套结构(Simberloff & Martin, 1991; Calmé & Desrochers, 1999)。千岛湖岛屿生境嵌套的形成, 可能是由岛屿间不同的土壤类型和水文地理学因素造成的(Wang et al, 2010)。

植物物种丰富度对蛙类和蜥蜴类的嵌套格局也有显著影响, 这可能是由于植物物种丰富度高的栖息地能为蛙类和蜥蜴类提供繁殖和掩蔽场所(Simberloff & Martin, 1991; Calmé & Desrochers, 1999)。这些掩蔽场所不仅能让蛙类和蜥蜴类躲避天敌捕食, 也能减少蛙类因阳光照射而造成的水分散失, 这是由蛙类的皮肤通透性特点造成的; 而对于蛇类, 其皮肤具有的鳞片能有效防止水分散失, 这可能是蛇类的嵌套格局与植物物种丰富度关系不明显的原因之一(Halliday & Adler, 2002)。因此, 由岛屿间植被丰富度差异造成的不同程度的限制作用可能使蛙类和蜥蜴类在一定程度上呈现出嵌套格局, 而对蛇类影响不大。

隔离度不影响两栖爬行类群落嵌套格局的形成, 不支持选择性迁移假说。根据该假说, 由于物种扩散能力的差异, 扩散能力强的物种将占领多数岛屿, 而扩散能力差的物种往往只能在隔离度较小、面积较大的岛屿定居(Cook & Quinn, 1995)。这样, 大岛屿自然拥有物种库中的多数物种, 而小岛屿只拥有少于扩散能力强的物种, 从而形成嵌套结构(Chen & Wang, 2004)。由于两栖爬行类动物迁移能力较弱, 迁移距离有限, 可能在千岛湖岛屿形成后很少在岛屿间发生迁移(Wang et al, 2010)。因此不能用选择性迁入假说来解释两栖爬行类群落嵌套格局的形成。

尽管嵌套格局广泛存在于许多研究类群(Wright et al, 1998), 但迄今为止两栖爬行类还很少被关注。目前仅有的少数研究表明, 片段化生境的面积大小是决定两栖爬行类嵌套格局的主要因素(Li et al, 1998; Mac Nally & Brown, 2001; Hecnar et al, 2002), 这与我们的研究结果相似。但是, Watling et al (2009) 对新热带片段化森林岛屿(forest islands)两栖爬行类的研究却发现, 隔离度是影响嵌套格局形成的主要因素, 这与我们的研究结果相反。隔离度在本研究和 Watling et al (2009) 研究中作用的不同, 可能主要是由于二者之间在基质(matrix)类型、隔离时间、隔离度变化程度等方面的不同所产生的。但是, 关于生境类型和植物物种丰富度在两栖爬行类群落嵌套格局形成中的作用, 除本研究外, 其余研究未有涉及, 需深入研究。

3.2 保护建议

嵌套结构在保护生物学上具有特殊意义, 为自然保护区的最优化设计提供了新的视角(Chen & Wang, 2004)。我们通过对千岛湖两栖爬行类群落的嵌套程度及其影响因素进行研究, 发现两栖爬行类群落整体上呈现嵌套分布格局, 且又与岛屿面积和生境类型显著相关。因此, 我们认为千岛湖两栖爬行类动物群落嵌套格局的形成是由选择性灭绝和生境嵌套共同决定的。研究表明, 那些面积较大、

植物物种丰富度高和生境类型多的岛屿包含更多的物种，能够为两栖爬行类提供良好的生存和栖息环境(Wang et al, 2009)。因此，我们建议在制定千岛湖两栖爬行类物种多样性保护对策时，应该对那些面积较大、植物物种丰富度高和生境类型多的岛屿予以重点关注。

3.3 结论与展望

嵌套格局是研究群落结构的有效工具(Worthen, 1996)。首先，嵌套格局不仅关注群落的物种丰度(species richness)和多度(abundance)，更重要的是它还关注群落组成(community composition)(Worthen, 1996)；其次，嵌套格局分析仅仅基于物种是否出现的“存在”(presence)与“不存在”(absence)数据。由于该类数据非常容易获得，因此嵌套格局为分析群落结构提供了经济有效的研究工具(Wright et al, 1998)。鉴于目前两栖爬行类正经历全球性的种群下降和灭绝危机(Stuart et al, 2004; Whitfield et al, 2007)，而现在有关该类群嵌套格局研究还很少被关注，因此以后应该加强该领域的研究。

致谢：千岛湖本地的章庙元等渔民为野外工作提供了大量人力帮助，特此致谢！

参考文献：

Adler GH, Seamon JO. 1991. Distribution and abundance of a tropical Rodent, on islands in Panama [J]. *J Trop Ecol,* **7**(3): 349-360.

Andrén H. 1994. Can one use nested subset pattern to reject the random sample hypothesis? Examples from boreal bird communities [J]. *Oikos,* **70**(3): 489-491.

Baber MJ, Fleishman E, Babbitt KJ, Tarr TL. 2004. The relationship between wetland hydroperiod and nestedness patterns in assemblages of larval amphibians and predatory macroinvertebrates [J]. *Oikos,* **107**: 16-27.

Bird BM, Boecklen WJ. 1998. Nestedness and migratory status of avian assemblages in North America and Europe [J]. *Biodivers Conserv,* **7**(10): 1325-1331.

Blake JG. 1991. Nested subsets and the distribution of birds on isolated woodlots [J]. *Oecologia,* **5**(1): 58-66.

Bolger DT, Alberts AC, Soule ME. 1991. Occurrence patterns of bird species in habitat fragments: sampling, extinction, and nested species subsets [J]. *Amer Naturalist,* **137**(2): 155-166.

Burkey TV. 1995. Extinction rates in archipelagoes: implications for populations in fragmented habitats [J] . *Conserv Biol,* **9**(3): 527-541.

Calmé S, Desrochers A. 1999. Nested bird and micro-habitat assemblages in a peatland archipelago [J]. *Oecologia,* **118**(3): 361-370.

Chen HJ, Li FL. 1990. The effect of human action on community structure in amphibia [J]. *Zool Res,* 11(3): 199-203. [陈火结，李芳林. 1990. 人类活动对两栖动物群落结构的影响. 动物学研究, 11(3): 199-203.]

Chen SH, Wang YJ. 2004. Nestedness pattern of insular community assemblages and its application [J]. *Chn J Ecol,* **23**(3): 81-87. [陈水华，王玉军. 2004. 岛屿群落组成的嵌套格局及其应用. 生态学杂志, **23**(3): 81-87.]

Conroy CJ, Demboski JR, Cook JA. 1999. Mammalian biogeography of the Alexander Archipelago of Alaska: a north temperate nested fauna [J]. *J Biogeogr,* **26**(2): 343-352.

Cook RR, Quinn JF. 1995. The influence of colonization in nested species subsets [J]. *Oecologia,* **102**(4): 413-424.

Cutler A. 1991. Nested faunas and extinction in fragmented habitats [J]. *Conserv Biol,* **5**(4): 496-505.

Cutler AH. 1994. Nested biotas and biological conservation: metrics, mechanisms and meaning of nestedness [J]. *Landscape Urban Plan,* **28**(1): 73-82.

Darlington PJ. 1957. Zoography: the Geographical Distribution of Animals [M]. New York: John Wiley.

Dobson AP, Pacala SW. 1992. The parasites of Anolis lizards the northern Lesser Antilles II. The structure of the parasite community [J]. *Oecologia,* **91**(1): 118-125.

Fernandez-Juricic E. 2004. Spatial and temporal analysis of the distribution of forest specialists in an urban-fragmented landscape (Madrid, Spain): implications for local and regional bird conservation [J]. *Landscape Urban Plan,* **69**(1): 17-32.

Ficetola GF, Bernardi FD. 2004. Amphibians in a human-dominated landscape: the community structure is related to habitat features and isolation [J]. *Biol Conserv,* **119**(2): 219-230.

Fleishman E, Betrus CJ, Blair RB, Nally RM, Murphy DD. 2002. Nestedness analysis and conservation planning: the importance of place, environment, and life history across taxonomic groups [J]. *Oecologia,* **133**(1): 78-89.

Granado-Lorencio C, Cerviá J, Lima C. 2007. Floodplain lake fish assemblages in the Amazon River: directions in conservation biology [J]. *Biodivers Conserv,* **16**(3): 679-692.

Greve M, Gremmen NM, Gaston KJ, Chown SL. 2005. Nestedness of Southern Ocean Island biotas: ecological perspectives on a biogeographical conundrum [J]. *J Biogeogr,* **32**(1): 155-168.

Halliday T, Adler K. 2002. The New Encyclopedia of Reptiles and Amphibians [M]. Oxford: Oxford University Press.

Hecnar SJ, Casper GS, Russell RW, Hecnar DR, Robinson JN. 2002. Nested species assemblages of amphibians and reptiles on islands in the Laurentian Great Lakes [J]. *J Biogeogr,* **29**(4): 475-489.

Higgins CL, Willig MR, Strauss RE. 2006. The role of stochastic processes in producing nested patterns of species distribution [J]. *Oikos,* **114**(1): 159-167.

Honnay O, Henry M, Choppin P. 1999. Nested plant communities in deciduous forest fragments: species relaxation or nested habitats [J]. *Oikos,* **84**(1): 119-129.

Jaeger RG. 1994. Transect Sampling. Measuring and Monitoring Biological Diversity: Standard Methods for Amphibians [M]. Washington: Smithsonian Institution Press.

Laurance WF, Lovejoy TE, Vasconcelos HL, Bruna E M, Didham R K, Stouffer PC, Gascon C, Bierregaard RO, Laurance SG, Sampaio E. 2002. Ecosystem decay of Amazonian forest fragments: a 22-year investigation [J]. *Convers Biol,* **16**(3): 605-618.

Li YM, Niemelä J, Li DM. 1998. Nested distribution of amphibians in the Zhoushan archipelago, China: can selective extinction cause nested subsets of species? [J]. *Oecologia,* **113**(4): 557-564.

Lomolino MV. 1996. Investigating causality of nestedness of insular

communities: selective migrations or extinctions [J]? *J Biogeogr,* **23**(5): 699-703.

Loo SE, Mac Nally R, Quinn GP. 2002. An experimental examination of colonization as a generator of biotic nestedness [J]. *Oecologia,* **132**(1): 118-124.

McGarigal K, Cushman SA. 2002. Comparative evaluation of experimental approaches to the study of habitat fragmentation effects [J]. *Ecol Appl,* **12**(2): 335-345.

Mac Nally R, Brown GW. 2001. Reptiles and habitat fragmentation in the box-ironbark forests of central Victoria, Australia: predictions, compositional change and faunal nestedness [J]. *Oecologia,* **128**(1): 116-125.

Mac Nally R, Horrocks G, Bennett AF. 2002. Nestedness in fragmented landscapes: birds of the box-ironbark forests of south-eastern Australia [J]. *Ecography,* **25**(6): 651-660.

Meyer CFJ, Kalko EKV. 2008. Bat assemblages on Neotropical land-bridge islands: nested subsets and null model analyses of species co-occurrence patterns [J]. *Divers Distrib,* **14**(4): 644-654

Moore JE, Swihart RK. 2007. Toward ecologically explicit null models of nestedness [J]. *Oecologia,* **152**(4): 763-777.

Nielsen A, Bascompte J. 2007. Ecological networks, nestedness and sampling effort [J]. *J Ecol,* **95**(5): 1134-1141.

Pan XF, Zhou W, Zhou YW, Jiang GS. 2002. A summary of studies on amphibian population ecology in China [J]. *Zool Res,* **23**(5): 426-436. [潘晓赋, 周伟, 周用武, 江桂盛. 2002. 中国两栖类种群生态研究概述. 动物学研究, **23**(5): 426-436.]

Patterson BD, Atmar W. 1986. Nested subsets and the structure of insular mammalian faunas and archipelagos [J]. *Biol J Linn Soc,* **28**(1-2): 65-82.

Rodriguez-Girones MA, Santamaria L. 2006. A new algorithm to calculate the nestedness temperature of presence-absence matrices [J]. *J Biogeogr,* **33**(5): 924-935.

Schoener TW, Schoener A. 1983. Distribution of vertebrates on some very small islands. I. Occurrence sequences of individual species [J]. *J Anim Ecol,* **52**(1): 209-235.

Schouten MA, Verweij PA, Barendregt A, Kleukers RJM, de Ruiter PC. 2007. Nested assemblages of Orthoptera species in the Netherlands: the importance of habitat features and life-history traits [J]. *J Biogeogr,* **34**(11): 1938-1946.

Simberloff D, Martin JL. 1991. Nestedness of insular avifaunas: simple summary statistics masking complex species patterns [J]. *Ornis Fennica,* **68**: 178-192.

Stuart SN, Chanson JS, Cox NA, Young BE, Rodrigues ASL, Fischman DL, Waller RW. 2004. Status and trends of amphibians declines and extinctions worldwide [J]. *Science,* **306**(5702): 1783-1786.

Vitousek P, Mooney HA, Lubchenco J, Melillo JM. 1997. Human domination of Earth’s ecosystems [J]. *Science,* **277**(5325): 494-499.

Watling JI, Gerow K, Donnelly MA. 2009. Nested species subsets of amphibians and reptiles on Neotropical forest islands [J]. *Anim Conserv,* **12**(5): 467-476.

Wang YP, Zhang J, Feeley KJ, Jiang PP, Ding P. 2009. Life-history traits associated with fragmentation vulnerability of lizards in the Thousand Island Lake, China [J]. *Anim Conserv,* **12**(4): 329-337.

Wang YP, Bao YX, Yu MJ, Xu GF, Ding P. 2010. Nestedness for different reasons: the distributions of birds, lizards and small mammals on islands of an Inundated Lake [J]. *.Divers Distrib,* **16**(5): 862-873.

Wang YP, Chen, SH Ding P. 2011. Testing multiple assembly rule models in avian communities on islands of an inundated lake, Zhejiang Province, China [J]. *J Biogeogr,* **38**(7): 1330-1344.

Whitfield SM, Bell KE, Philippi T, Sasa M, Bolaños F, Chaves G, Savage JM, Donnelly MA. 2007. Amphibian and reptile declines over 35 years at La Selva, Costa Rica [J]. *Proc Natl Acad Sci USA,* **104**(20): 8352-8356.

Worthen WB. 1996. Community composition and nested subset analyses: basic descriptors for community ecology [J]. *Oikos,* **76**(3): 417-426.

Wright DH, Patterson BD, Mikkelson GM, Cutler A, Atmar W. 1998. A comparative analysis of nested subset patterns of species composition [J]. *Oecologia,* **113**(1): 1-20.

Zhang JC, Wang YP, Jiang PP, Li P, Yu MJ, Ding P. 2008. Nested analysis of passeriform bird assemblages in the Thousand Island Lake region [J]. *Biodiver Sci,* **16**(4): 321-331. [张竞成, 王彦平, 蒋萍萍, 李鹏, 于明坚, 丁平. 2008.千岛湖雀形目鸟类群落嵌套结构分析. 生物多样性, **16**(4): 321-331.]

Zhang SY, Ding BY. 1986. Flora of Zhejiang [M]. Hangzhou: Zhejiang Science and Technology Press. [章绍尧, 丁炳扬. 1986. 杭州: 浙江植物志. 浙江科学与技术出版社.]

Zheng CZ. 2005. Keys of Seed Plants in Zhejiang [M]. Hangzhou: Zhejiang Science and Technology Press. [郑朝宗. 2005. 浙江种子植物检索鉴定手册. 杭州: 浙江科学与技术出版社.]

动 物 学 研 究 2012，Oct. 33(5): 447−454 CN 53-1040/Q ISSN 0254-5853
Zoological Research DOI：10.3724/SP.J.1141.2012.05447

白蜡虫若虫口器超微结构特征与生态适应性

赵杰军[1,3], 陈晓鸣[1,2,*], 王自力[1,2], 叶寿德[1,2], 陈 勇[1,2], 王绍云[1,2]

(1. 中国林业科学研究院资源昆虫研究所，云南 昆明 650224; 2. 国家林业局资源昆虫培育与利用重点实验室, 云南 昆明 650224;
3. 南京林业大学 森林资源与环境学院, 江苏 南京 210037)

摘要：超微结构表明, 白蜡虫雌、雄若虫口器结构相同, 均由外部的口针、下唇和唇基板, 以及内部的口针囊和幕骨组成, 且具有以下显著特点：(1)口器具口针囊, 幕骨发达; (2)上唇退化, 下唇短小、不分节; (3)下颚针具 T 型锁紧密相扣; (4)口器刚毛稀疏, 感器单一。其中, 口器上、下唇退化, 幕骨发达, 口针束伸缩可能主要受幕骨和口针囊控制, 而口器感器退化则可能与其取食行为的高度特化有关。白蜡虫雌、雄虫口针长度和直径差异不显著(P>0.05), 而 1 龄、2 龄若虫口针长度和直径差异显著(P<0.05)。1 龄若虫由于口针较短, 口针束较柔软, 适宜穿刺较薄的叶片, 故生活在叶片上, 而 2 龄若虫由于口针较长, 口针束较为坚硬, 适宜穿刺比叶片厚的树皮, 故返回枝条生活, 且若虫从叶片转移到枝条上生活, 可能是基于寻求安全栖息地和稳定食物来源。

关键词：白蜡虫; 口器; 超微结构; 生态适应性
中图分类号：S899.1 **文献标志码：**A **文章编号：**0254-5853-(2012)05-0447-08

Ultrastructure of *Ericerus pela* (Chavannes) nymph mouthparts and ecological adaptations

ZHAO Jie-Jun[1,3], CHEN Xiao-Ming[1,2,*], WANG Zi-Li[1,2], YE Shou-De[1,2], CHEN Yong[1,2], WANG Shao-Yun[1,2]

(1. *Research Institute of Resource Insects*, *Chinese Academy of Forestry*, *Kunming Yunnan* 650224, *China*;
2. *Key Laboratory of Cultivation and Utilization of Resource Insects of State Forestry Administration*, *Kunming Yunnan* 650224, *China*;
3. *College of Forest Resources and Environment Nanjing Forestry University*, *Nanjing Jiangsu* 210037, *China*)

Abstract: The ultrastructure of nymph mouthparts of the Chinese white wax scale (CWWS), *Ericerus pela,* consists internally of the crumena, tentorium, the stylet bundle, comprised of two mandibular stylets and two maxillary stylets, and the external clypeolabral shield, labium and sensilla. The mouthpart morphology and structures of the female nymphs are similar to the male. The mouthparts of CWWS have significantly different features in comparison to aphids and other coccids. First, the mouthparts of CWWS have a crumena and a developed tentorium. Second, the labrum is highly degraded and the labium is short and one-segmented. Third, the maxillary stylets have two ‘T’ type locks. Lastly, the hairs of the mouthpart are sparse and the sensilla are simple. As the labrum and labium of CWWS displayed a high degree of degradation and the tentorium was found to be highly developed, the stretching of the stylet bundle was considered to be controlled by the tentorium and crumena together. Furthermore, the degraded sensilla may be related to a specialization of feeding behavior. There were no significant differences in the length and diameter of the stylet bundles between the female and male. However, the length and diameter of the stylet bundles were significantly different between the first instar nymphs and the second instar nymphs. The first instar nymphs had stylet fascicles that were shorter and soft and initially lived on the leaves of the host trees, presumably because the leaves were thinner and they were able to pierce the leaves while the stylet bundle was relatively soft. However, the second instar nymphs had stylet bundles that were relatively hard. After the numphs molted, the degree of ossification of the stylet bundles was enhanced (increased) and the nymphs returned to the branches for living, where the strengthened stylet bundles may provide a better adaption for the thicker bark. [0]All told, the first and second stage instar CWWS nymphs switched from leaves to the branches in order to find a safe habitat and stable food source.

收稿日期：2012-05-18；接受日期：2012-06-10
基金项目：国家林业局林业公益性行业科研专项经费项目(201204602); “十二五”国家科技计划课题(2011BAD33B02); 国家自然科学基金项目(30771736); 中国林科院中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金项目(riricaf201004M)
*通信作者(Corresponding author)，E-mail: cafcxm@tom.com

Key words: Chinese white wax scale ; Mouthpart; Ultrastructure; Ecological adaptations

口器是刺吸式昆虫与寄主植物之间营养物质流动与信息传递的桥梁和纽带。刺吸式昆虫以口针刺穿寄主植物薄壁细胞或韧皮筛管吸食营养物质,同时分泌唾液解毒次生性化学物质并破坏寄主防御性反应 (Miles, 1968, 1972, 1999; Powell et al, 2006; Walling, 2008)。口器上着生的嗅觉、味觉和触觉等各种感受器在寄主植物定位和识别等选择过程中发挥重要作用(Schoonhoven et al, 2005)。近几十年来, 由于电子显微技术的发展, 对危害农作物的主要刺吸式口器昆虫, 如叶蝉(Leopold et al, 2003; Zhao et al, 2010)、粉虱(Rosell et al, 1995)、蝽象(Rani et al, 2005)和蚜虫(Forbes, 1966; Tjallingii, 1978; Wensler, 1977)等类群的口器超微结构特征进行了深入研究, 而关于蚧虫类相关研究则相对较少。

蚧虫是半翅目 (Hemiptera)蚧总科 (Coccoidea)昆虫的总称, 已报道 7364 种(Ben-Dov, 2006), 除少数几种蚧虫如白蜡虫(*Ericerus pela*)、紫胶虫(*Kerria* sp.)和胭脂虫(*Dactylopius coccus*)属于资源昆虫外, 绝大多数属于农林害虫。Koteja (1974)在光学显微镜下对蚧虫雌成虫口器下唇形态进行了系统研究, 结果表明蚧虫各科、属和种之间下唇节数、长度和刚毛数存在差异; Le Rü et al (1995)用透射电镜和扫描电镜深入研究了木薯粉蚧 (*Phenacoccus manihoti* Matile Ferrero) 4 龄若虫口器下唇超微结构, 发现其下唇分布味觉、嗅觉和触角感受器; Brożek (2006)用透射电镜研究了 7 科蚧虫雌成虫口针横切面超微结构特征, 结果表明蚧虫口针束超微结构基本一致, 仅在下颚连锁方式上存在细微差异。前期蚧虫口器的研究以成虫或者老熟若虫为材料, 而针对蚧虫 1 龄若虫或者微小蚧虫口器的研究则相对较少。

白蜡虫[*Ericerus pela* (Chavannes)]属于蜡蚧科 (Coccidae) 白蚧属 (*Ericerus*)单种属昆虫, 其雄虫分泌的白蜡广泛应用医药、食品、化妆品等行业 (Chen, 2011)。以往的研究虽然对白蜡虫各龄期形态特征及系统分类等进行了探讨, 但基本未提及口器形态特征(Sasaki, 1904; Yano, 1915; Kuwana, 1923; Ferris, 1950; De Lotto, 1971)。

白蜡虫 1 龄若虫选择叶片寄生, 雌虫选择叶片正面固定, 雄虫选择叶片背面固定。2 龄若虫在枝条树皮上寄生, 雌虫选择向光面固定, 雄虫选择背光面固定, 且固定后不再移动, 直至世代结束 (Chen et al, 1997)。该固定位点转移可能与其口器结构有关, 但目前, 其寄主选择行为与寄生习性的特殊性与口器结构之间的关系缺乏资料报道。本文以白蜡虫的定叶和定杆若虫为材料, 观察其若虫口器的形态与超微结构, 探讨口器形态结构与选择行为和寄生习性之间的关系, 为进一步深入了解白蜡虫与寄主植物之间的相互关系提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料

白蜡虫定叶若虫(1 龄若虫)和定杆若虫(2 龄若虫)采集于云南省嵩明县小哨乡杨官庄(E24°26′28″; N100°50′45″)女贞(*Ligustrum lucidum* Ait.)树。根据 Kuwana (1923)和 Ferris (1950)的白蜡虫分类资料, 鉴定定叶若虫和定杆若虫雌、雄虫性别。采集的标本分为三份, 一部分投入 3.5%戊二醛固定液(用 0.1 mol/L pH7.2 磷酸缓冲液配制)用于电镜分析, 一部分投入 FAA 固定液(福尔马林-醋酸-酒精混合液:福尔马林 5 mL, 冰醋酸 5 mL, 65%酒精 90 mL)用于玻片分析, 其余作活虫解剖分析。

1.2 电镜样品制备

1.2.1 扫描电镜样品 标本用二甲苯和丙酮交替除蜡后, 超声波清洗仪清洗 4 h, 除去虫体表面粘附物; 逐级酒精脱水, 临界点干燥; 导电胶粘接, 离子溅射镀膜; TM3000 扫描电镜观察虫体口器上下唇、口针及刚毛形态。

1.2.2 透射电镜样品 标本用磷酸缓冲液反复冲洗 3 次, 每次 30 min; 1%四氧化锇(用 0.1 mol/L pH7.2 磷酸缓冲液配制)室温固定 1 h, 用磷酸缓冲液反复冲洗, 逐级丙酮脱水, 每次 30 min; Epon812 浸透包埋, 37、45、60 ℃聚合 72 h; LKB-V 型超薄切片机切片, 厚度为 50 nm; 饱和醋酸铀和 1%柠檬酸铅双染; JEM-100CX 型透射电镜观察口针束横切面形态与结构。

1.3 玻片标品制备

取 FAA 固定液保存的标本, 10%KOH 软化; 逐级酒精脱水; Euparal 胶封片; NikonE800 相差显微

镜观察口器幕骨形态与结构。

1.4　口针和口针囊解剖

取活体标本，Leica 光学解剖镜下测量口针伸出的长度；解剖针解剖取出口针和口针囊，NikonE800 相差显微镜下测量口针长度；各龄期每性别各解剖标本 15 头。

1.5　蚜虫口器结构特征

资料来源于 Adams & Fyfe(1970)、Forbe(1966)、Miles(1968, 1972, 1999)、Pollard(1973)、Tjallingii (1978) 和 Uzest et al(2010)对蚜虫口器结构特征的报道。

2　结　果

2.1　口器形态与结构特征

若虫口器从头腹面后端发出，向后置于体腹面，不超过前足(pc)基线(图 1a)。雌、雄若虫形态结构相似，由外部的唇基板(lc)、下唇(lb)、口针束(st)以及内部的口针囊(cr)和幕骨(te)(图 1，2)等结构组成；上唇退化为唇基板，下唇退化短小，口针束和幕骨发达；口针束由 1 对上颚针(md)和 1 对下颚针(mx)组成(图 1d)；口针束(st)丝状卷曲于膜质透明的口针囊(cr)(图 2a)；幕骨缺乏口针杠杆(图 2b)；若虫口针束伸缩可能受下唇和口针囊控制。

2.1.1　唇基板　若虫上唇高度退化为唇基板，长 31 μm，宽 29 μm，近梯形，覆盖下唇基部背面，唇基板光滑，缘沟凹陷明显，中部着生毛型感器(S.t.I)1 对，长 3.7 μm(图 1 b)。

2.1.2　下唇　若虫下唇退化为 1 节，短小，锥状(图 1a)，两侧反卷，在中央合拢成中空管状结构，称为“假管”，包裹口针束；从腹面可见“假管”中央有一纵向缝，称为下唇沟(lba)(图 1a)；唇基宽 38 μm，长 42 μm；下唇尖(tlb)圆形，尖端有开口，口针束尖从开口伸出和收缩(图 1a)；刚毛数量稀少，感器退化，仅分布 3 对毛状感器和 1 对锥形感器；唇基腹面下唇沟两侧对称分布毛状感器(S.t.II)1 对，长为 12 μm；唇端部侧面下唇沟两侧对称分布毛状感器(S.t.III)1 对，长 9.7 μm；唇端部背面以下唇沟为对称轴对称分布毛状感器(S.t.IV)1 对,长 8.3 μm；唇端部腹面下唇沟两侧对称分布短小、粗状的锥状感器(Sc)1 对，长 2.2 μm(图 1c)，直立，端部较钝，毛状感器端部尖锐，略歪，毛状和锥形感器基部插入表皮突起形成的窝内。

2.1.3　口针束

2.1.3.1　外部形态　若虫口针表面光滑，从下唇端部伸出(图 1c)，部分收缩于口针囊中(图 2a)。定叶、定杆标本口针束多数分散，但下颚针紧密镶嵌不分离(图 1d)，仅有少部分标本口针成束，即上颚针包裹下颚针。

2.1.3.2　内部结构特征　若虫口针束横切面透射电镜观察结果表明，口针束包括上、下颚针各 1 对，多数分离。上颚针从两侧包裹下颚针，下颚针位于口针束内侧且紧密镶嵌成对(图 1e)。

上颚针横切面为新月形，壁内、外光滑，左上颚(LMd)和右上颚(RMd)分别着生 1 根直径较大的管状孔，即左、右上颚窦，左上颚窦分布神经轴突(NT)(图 1e)，右上颚窦中空。左、右上颚厚度一致，为 0.5 μm。上颚针左、右不对称，宽度和形态有细微差别，宽度分别为 1.6 μm 和 2.0 μm，且右上颚针边缘突起较左上颚针明显。

口针束下颚针嵌合横切面为长方形，边缘光滑、平截。左下颚(LMx)和右下颚(RMx)各着生 1 根管状孔，即左、右下颚窦。左、右下颚窦横切面呈腊肠形，中空，内缘有明显突起。左、右下颚针纵向着生沟和脊，彼此互补，之间通过中锁(ML)、腹锁(VL)和背锁(DL)紧密镶嵌(图 1f)。背锁和腹锁属于 T-形锁，牢固扣紧左、右下颚针。背锁由 4 个连锁过程组成，即左下颚针 A′和 B′连锁，以及右下颚针 A 和 B 连锁。腹锁通过右下颚针 T-形锁 E 和左下颚针 D′ 和 E′钩锁组成。中锁属于棒形锁，通过左下颚针棒形锁 C′和右下颚针 C、D 连锁组成(图 1f)。

左、右下颚针连锁形成唾液窦(SC)和食物窦(FC)。右下颚针上部连锁 C 直，下部连锁 D 直且顶端较宽，下端连锁形成唾液窦。唾液窦着生左下颚针，内壁光滑，半圆型，直径为 0.14 μm，较食物窦为小。背锁和中锁连锁形成食物窦，内壁凸凹不平，近圆形，直径为 0.27 μm(图 1f)。

2.1.4　口针囊　口针囊(cr)为透明的袋状膜质，着生于虫体内唇基板下，开口于下唇基沟，悬垂于虫体内(图 2a)。口针囊内口针束(st)卷曲。

2.1.5　幕骨　幕骨位于唇基板下虫体内，高度骨化，玻片标本清晰显示幕骨由前幕骨体(aa)、咽板(hp)和侧唇基(lcs)等结构组成(图 2b)，且未观察到连接上、下颚针的上、下颚杆。

2.2　定叶、定杆若虫口针长度比较

不同标本测量所得口针长度之间存在差异显著(表 1)。活体和电镜测量仅测量口针伸出下唇的

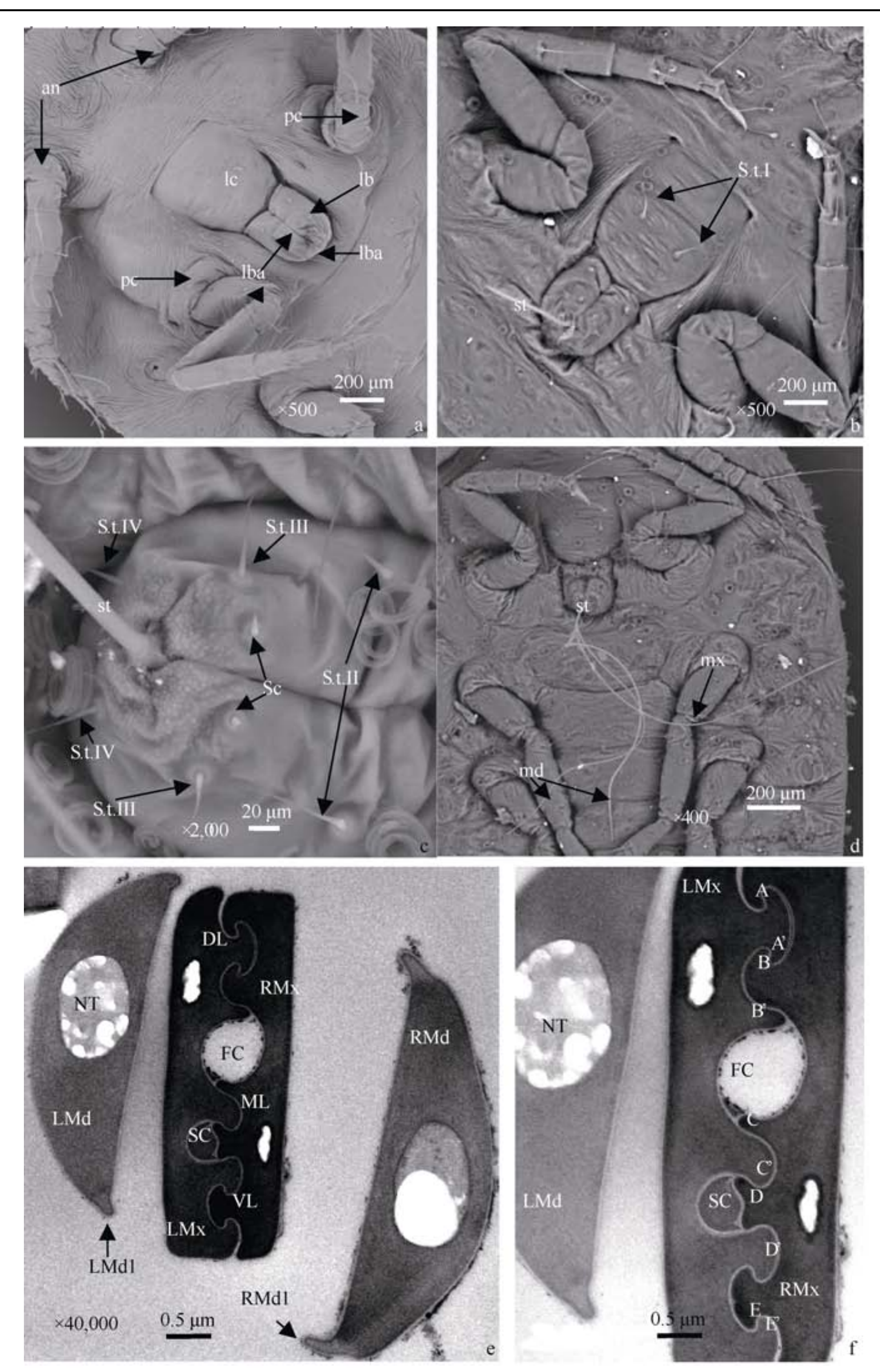


图 1 白蜡虫若虫口器电镜图

Fig. 1 Scanning electron microscope and transmission electron microscope images of the mouthpart of the *Ericerus pela*(Chavannes) nymphs

a) 口器在头部腹面着生位置; b) 唇基板毛形感器(S.t.I); c) 下唇腹面观及其分布的感器; d) 口针束分散; e) 口针束横切面; f) 下鄂针连锁方式。

a) Position of mouthparts situated in the ventral head; b) Sensilla trichodea I of the clypeolabral shield; c) The posterior view of the sensilla distributed on the labium; d) Stylet bundle diversion; e) Transverse section of the stylet bundles; f) Locked ways of the maxillary stylets.

an：触角 Antennae; pc：前胸足 Prothorax legs; lc：唇基板 Clypeolabral shield; lb：下唇 Labium; lba：下唇尖 Labial tip; lbc：下唇沟 Labial groove; S.t.II~IV：毛状感器 Sensilla trichodea II~IV; Sc：锥形感器 Sensilla basiconica; st：口针 Stylet; md; 上鄂针 Mandibulary stylets; mx：下鄂针 Maxillary stylets; DL：背锁 Dorsal lock; ML：中锁 Middle lock; VL：腹锁 Ventral lock; FC：食物窦 Food canal; SC：唾液窦 Saliva canal; NT：神经树突 Neurodendrite; RMx：右下颚针 Rght maxillary stylets; RMd：右上颚针 Right mandibulary stylets; LMx：左下鄂针 Left maxillary stylets; LMd：左上鄂针 Left mandibulary stylet; A：背锁右上钩 Right upper hook of dorsal lock; A′：背锁左上 T-形锁 Left upper ‘T’type lock of dorsal lock; B：背锁右下钩 Right lower hook of dorsal lock; B′：背锁左下直钩 Left lower straight hook of dorsal lock; C：中锁右上直钩 Right upper straight hook of middle lock; C′：中锁左棒状连锁 Left clavate lock of middle lock; D：中锁右 T-形锁 Right ‘T’type lock of middle lock; D′：中锁左下钩 Left lower of middle lock; E：腹锁右 T-形锁 Right ‘T’type lock of ventral lock; E′：腹锁左下钩 Left lower of ventral lock; LMd1：左上鄂针突 Protuberance of left mandibulary stylets; RMd1：右上鄂针突 Protuberance of Right mandibulary stylets。



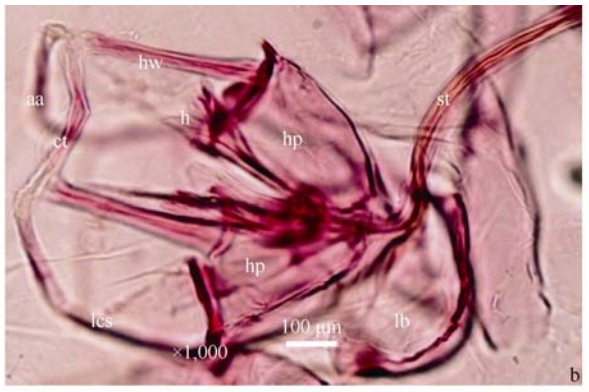


图 2　白蜡虫口器幕骨和口针囊显微图

Fig. 2　Micrograph of the crumena and tentorium of *Ericerus pela* (Chavannes) nymphs

a：口针囊 Crumena; b：幕骨 Tentorium; aa：Anterior arm 前臂; ct：幕骨体 Corpotemorium; cr：口针囊 Crumena; h：咽下部 Hypopharynx; hp：咽板 Hypopharyngial plate; hw：咽翅 Hypopharyngial wing; lb：下唇 Labium; lcs：侧唇基 Lateral clypeal sulcus; st：口针束 Stylet bundle。

表 1　不同测量方法测量的白蜡虫若虫口针长度比较

Tab. 1　Comparison of the stylet length from nymphs of *E. pela* measured by different methods

方法 Methods		直接/μm Direct measurement	解剖/μm Anatomical measurement	电镜/μm Electron measurement
雌虫 Female	范围 Range	72~412	380~460	156~256
	平均值 Mean	220	415	196
	标准差 *SD*	107	27	29
雄虫 Male	范围 Range	22~403	380~460	181~430
	平均值 Mean	294	414	232
	标准差 *SD*	106	30	70

$F_{♀(2, 42)}$=49.74, $F_{♂(2, 42)}$=18.14, $F_{0.05}$=3.22。

长度，不能代表口针实际长度，因此，虫体口针长度需由解剖测量获得。

定叶雌、雄若虫口针解剖平均长度分别为 415 μm 和 414 μm，差异不显著(图 3)(P>0.05, t-检验)。定叶若虫蜕皮后，转移到枝条树皮定杆生活，若虫口针长度增加 197 μm，雌、雄若虫口针解剖平均长度分别为 595 μm 和 612 μm，差异不显著(图 3)(P>0.05, t-检验)。定叶、定杆若虫口针长度差异显著(P<0.05, t-检验)(图 3)。

2.3　定叶、定杆若虫口针骨化程度比较

定叶雌、雄若虫口针束粗细无差异，平均直径为 1.6 μm; 定杆雌、雄若虫口针束粗细无差异，平均直径为 5.2 μm(图 4)。定叶、定杆若虫口针束直径差异显著(P<0.05, t-检验)(图 4)。即，定叶若虫蜕皮后，口针束长度与直径均增加，且直径增加 3 倍以上。

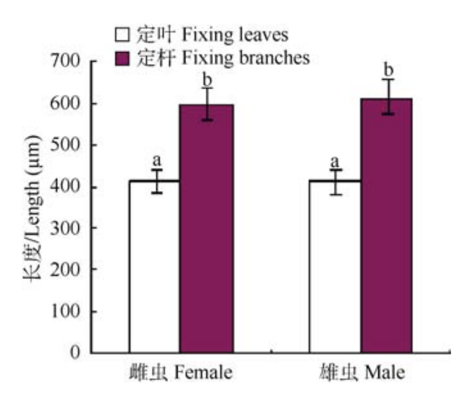


图 3　白蜡虫若虫口针长度比较

Fig. 3　Comparison of the stylet length of the Chinese white wax scale nymphs

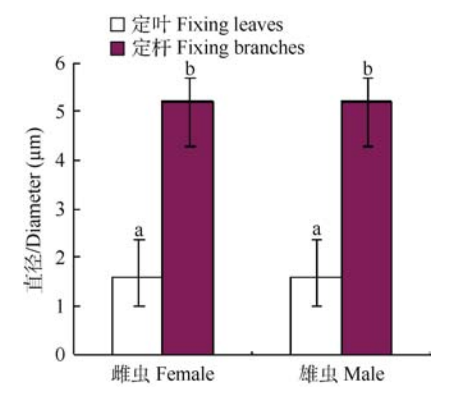


图 4　白蜡虫若虫口针直径比较

Fig. 4　Comparison of the stylet diameter of the Chinese white wax scale nymphs

2.4　白蜡虫与蚜虫口器的比较

白蜡虫与蚜虫口器结构最显著的区别为：(1)白蜡虫上唇退化为发达的唇基板，具有发达的幕骨

和口针囊; 蚜虫口器上唇不发生退化, 幕骨不发达, 缺少口针囊; (2) 白蜡虫口器下唇短小, 不分节; 蚜虫下唇较长, 多节; (3) 白蜡虫口针束端部收缩于下唇, 基部卷曲在口针囊; 蚜虫口针束收缩于下唇; (4) 白蜡虫下颚具有 T-形锁, 左、右下颚针之间通过 T-形锁和棒形锁相扣; 蚜虫下颚缺乏 T-形锁, 左、右下颚针之间通过棒形和钩形锁相扣; (5) 白蜡虫口器感器稀少, 仅在唇基板分布 1 对毛状感器、下唇分布 3 对毛状感器和 1 对锥形感器; 蚜虫口器感器浓密, 有毛状、锥形、刺形和钉状感器等(表 2)。

表 2 白蜡虫与蚜虫口器结构差异

Tab. 2 Differences in mouthpart structure between Chinese white wax scale and aphids

结构特征 Structure	白蜡虫 Chinese white wax scale	蚜虫 Aphids
唇基板 Clypeolabral shield	梯形, 着生刚毛 1 对	无
下唇 Labium	短小, 不分节	较长, 分节
口针囊 Crumena	袋状, 膜质、透明	无
幕骨 Tentorium	发达, 但缺乏上颚杆和下颚杆	不发达
口针束收缩 Stylet bundle coiled	口针尖收缩在下唇, 其余部分卷曲在口针囊	口针收缩在下唇
上颚 Mandibular	端部边缘锯齿状, 外壁有刻槽; 上颚窦着生神经组织	端部边缘锯齿状, 外壁有刻槽; 上颚窦着生神经组织
下颚 Maxillary	T-形背锁、棒形中锁和 T-形腹锁连锁形成下颚	棒形锁和钩形锁连锁形成下颚
唾液窦 Saliva canal	位于左下颚, 由棒形锁连锁形成	位于左下颚, 由棒形锁连锁形成
食物窦 Food calal	T-形背锁和棒形中锁连锁形成	钩形锁连锁形成
感器 Sensilla	刚毛稀少, 感器单一, 仅在唇基板分布 1 对毛状感器, 下唇分布毛状感器 3 对和锥形感器 1 对	刚毛浓密, 感器丰富, 有毛状、锥形、刺形和钉状感器等

3 讨 论

3.1 白蜡虫若虫口器特点

白蜡虫雌、雄若虫口器形态和结构相似, 与其它蚧虫基本相比, 主要区别在于白蜡虫口器下唇退化, 短小, 不分节; 口器感器退化, 刚毛稀少。其口器主要特点为：(1) 上唇高度退化为梯形的唇基板, 覆盖高度骨化的幕骨; (2) 下唇退化为短小、不分节的锥形结构, 其分布的感器也发生退化, 仅有毛状感器 3 对和锥形感器 1 对; (3) 口针束卷曲在口针囊, 针尖收缩于下唇, 口针束由上、下颚针各 1 对组成, 每针分布 1 根管状孔, 分别称为上、下颚窦, 上颚窦着生神经组织, 口针束在组织穿刺过程中具有调控功能(Pollard, 1973); (4) 上颚针边缘锋利, 端部边缘突起具齿, 外缘有刻槽, 边缘锯齿用于切割组织(Zhao et al, 2010); (5) 下颚针外缘光滑、平截, 通过 T-形背锁、棒形中锁和 T-形腹锁紧密嵌合形成唾液窦和食物窦, 证明下颚针的主要功能不是穿刺, 而是用唾液窦分泌唾液, 用食物窦汲取食物(Pollard, 1973)。白蜡虫口器幕骨缺乏连接上、下颚针的上、下颚杆, 推测其主要利用下唇、口针囊和口针束控制口针伸缩(Beardsley & Gonzalez, 1975)。

白蜡虫口针束左上颚窦观察到的神经组织, 在蚧虫类群中首次显示口针束存在神经组织的超微结构特征。Forbes (1966)在蚜虫口针束上颚中发现神经组织细胞, 并且提供了上颚窦神经组织细胞超微结构图片。Pesson (1944)描述了柑橘吹绵蚧(*Icerya purchasi*)口针上颚窦存在神经组织, Brożek (2006)报道 7 科蚧虫雌成虫口针束横切面超微结构显示上、下颚窦中空。因此, 白蜡虫口针上颚窦神经树突图片为蚧虫口针束存在神经组织提供了依据。

3.2 白蜡虫与蚜虫口器结构差异

白蜡虫和蚜虫口器在下唇和口针囊等结构特征上存在的显著差异导致了二者口针控制伸缩机制的差别。蚜虫下唇较长, 分节, 包裹口针束, 内部刻槽夹紧口针束, 操控口针伸缩 (Miles, 1968; Uzest et al, 2010)。蚧虫口器口针伸缩机制仍不清楚, 可能由幕骨和口针囊控制 (Beardsley & Gonzalez,

1975)。白蜡虫口器幕骨缺乏口针杠杆, 因此, 可能依赖下唇、口针束和口针囊共同操控口针。

白蜡虫和蚜虫口器的上颚形态和结构相似, 上颚边缘锋利, 端部锯齿状, 外壁着生刻槽, 表明白蜡虫与蚜虫的穿刺方法相同, 均利用上颚切割组织。

3.3　白蜡虫口器及其适应性

蚧虫口器刚毛数量减少、感器退化是其进化趋势, 与取食行为无关, 而与特化水平相关 (Koteja, 1985)。白蜡虫若虫口器着生感器稀少退化, 仅具接触感受功能, 可能与其寄生习性有关。白蜡虫整个生活周期仅发生 2 次短暂的移动, 1 龄若虫就近在枝条上向上爬行, 在叶片上寻找适宜的位点生活, 固定 3 周后蜕皮进入 2 龄, 2 龄若虫返回枝条上固定, 至此终生不再移动 (Wang et al, 2008), 其口器感器使用频率降低, 逐渐发生退化。而在整个世代周期中发生多次移动的刺吸昆虫种类, 需反复搜索适宜的固定位点, 故通常口器感器丰富, 有味觉、嗅觉和触角感受功能 (Zhao et al, 2010; Tjallingii, 1978)。如木薯粉蚧在整个生活周期中不断地移动固定位点, 其口器感器发达, 着生浓密刚毛, 有毛形、刺形和钉形等感器类型, 具有接触和嗅觉感受功能 (Le Rü et al, 1995)。因此, 刺吸昆虫寄生习性与口器感器发育密切相关。

白蜡虫口器外部感器退化, 内部感器上颚窦神经和上咽发达, 保持了刺吸昆虫口器内部感器结构特征。蚜虫上颚窦神经组织调控上颚针穿刺方向 (Forbes, 1966), 上咽识别从食物窦吸收的化学物质 (Powell et al, 2006)。刺吸式昆虫口器内部感器稳定性与口针刺探行为相关。与蚜虫等刺吸式昆虫口针束形态结构相似, 白蜡虫若虫上颚边缘锋利、突起, 端部边缘锯齿状, 下颚连锁横切面外缘光滑、平截, 形成唾液窦和食物窦。上颚锯齿状边缘穿刺并插入寄主组织后, 下颚跟进并从唾液窦分泌唾液形成唾液鞘, 同时食物窦汲取化学物质进入上咽感器作出判断, 决定是否继续刺探。同时, 其上颚神经组织也可通过感受内部厚壁组织作出改变刺探路径的决定。因此, 白蜡虫口器外部感器退化与其独特的寄生习性有关, 内部感器稳定与其刺探行为相关。

白蜡虫下颚左、右针之间通过 T-形背锁、棒形中锁和 T-形腹锁紧密嵌合, 形成唾液窦和食物窦, 该独特的连锁方式也与其寄生习性相关。蚜虫等刺吸昆虫下颚左、右针之间通过棒形锁和钩形锁嵌合, 缺少 T-形锁 (Zhao et al, 2010; Forbes, 1966; Pollard, 1973)。T-形锁难以分散和重新组合, 而棒形锁或钩形锁则相反。蚜虫下唇长, 分节, 口针束收缩于下唇, 受下唇各节内刻槽调控, 将分散的口针束重新组合成束 (Forbes, 1966)。蚧虫却相反, 下唇短小, 口针束端部收缩于下唇, 分散的口针束在口针囊内受血压影响重新组合成束 (Snodgrass, 1935)。蚧虫分散的口针束通过血压影响重新组合是不可能的。由此, 蚧虫下颚必须借助 T-形连锁紧密相扣, 以适应在长期固定不动的寄生过程中维持唾液窦和食物窦通畅。因此, 蚧虫类群除少数种类发生短暂的移动之外其余种类终身固定不动 (Foldi, 1997; Gullan & Kosztarab, 1997), 下颚针必须紧密嵌合保证食物窦和唾液窦正常运作。

白蜡虫定叶雌、雄虫口器结构一致, 口针长度或直径之间无差异, 因此, 雌、雄虫定叶面选择差异与口器结构、口针长度和直径无关, 而与光照相关, 雄虫避光固定叶背面, 雌虫固定叶正面(Chen et al, 1997)。

白蜡虫固定位点在不同的寄主组织器官之间的转移现象与其口针的骨化程度密切相关。蚜虫和蚧虫的口针骨化程度与口针直径有关, 口针直径每增加一倍, 口针骨化程度也随之增加一倍 (Heriot, 1934)。白蜡虫定叶、定杆若虫口针束直径之间存在显著差异, 分别为 1.6 μm 和 5.2 μm, 表明定杆若虫口针的骨化程度比定叶若虫高 3 倍以上。1 龄若虫口针骨化程度低而柔软, 难以刺穿枝条高度木栓化的树皮, 必须选择组织较为柔软的器官叶片生活; 随后口针充分发育, 骨化程度增加三倍以上, 蜕皮进入 2 龄若虫, 从叶片转移至枝条取食。蚜虫等刺吸式口器昆虫初孵若虫口针较为柔软, 选择新萌发叶片取食, 若虫蜕皮后, 口针骨化程度增加, 转移到老熟叶片或者茎杆上取食 (Dixon, 2005)。七叶树蚧 (*Pulvinaria regalis*) 雌成虫在枝条上产卵, 初孵幼虫选择叶片背面固定取食, 当寄主叶片将落叶时, 转移至枝条继续取食(Speight & Nicol, 1984)。

白蜡虫从叶片转移至枝条生活, 从安全和资源角度分析, 叶片受到刺吸式昆虫胁迫后, 容易掉叶, 使昆虫失去栖息地和食物资源, 而枝条对昆虫的抵抗能力较强, 能为刺吸式昆虫为提供安全的栖息地和稳定的食物来源。

致谢：本文扫描电镜观察分析得到了中国林业

科学研究院资源昆虫研究所重点实验室何锐工程师、昆明医学院电子显微中心宋精灵高级工程师和西南林业大学植物保护专业 2008 级赵琴慧同学的大力帮助，谨致谢忱！

参考文献：

Adams JB, Fyfe FW. 1970. Stereoscan views of some aphid mouthparts [J]. *Can J Zool*, 48: 1033-1034.

Beardsley JWJ, Gonzalez RH. 1975. The biology and ecology of armored scales [J]. *Annu Rev Entomol*, 20:47-73.

Ben-Dov Y. 2006. A systematic catalogue of eight Scale Insect families (Hemiptera: Coccoidea) of the world Aclerdidae, Asterolecaniidae, Beesoniidae, Carayonemidae, Conchaspididae, Dactylopiidae, Kerriidae and Lecanodiaspididae [M]. Amsterdam: Elsevier, 1-368.

Brożek J. 2006. Internal structures of the mouthparts of Coccinea(Hemiptera: Sternorrhyncha) [J]. *Pol Pismo Entomol*, 75(2): 255-265.

Chen XM. 2011. Natural population ecology of *Ericerus pela* [M]. Beijing: Science press, 1-136. [陈晓鸣. 2011. 白蜡虫自然种群生态学 [M]. 北京：科学出版社, 1-136.]

Chen XM, Ye SD, Chen Y, Mao YF, Wang ZL, Wang SY. 1997 Studies on distribution characteristics of Chinese white wax scale(*Ericerus pela* Chavannes) on host plant. *Forest Res*, 10(4): 415-419. 陈晓鸣, 叶寿德, 陈勇, 毛玉芬, 王自力, 王绍云. 1997 白蜡虫在寄主植物上的分布特征研究 [J]. 林业科学研究, 10(4): 415-419.]

De Lotto G. 1971. On some genera and species of wax scales (Homoptera: Coccidae) [J]. *J Nat Hist*, 5(2): 133-153.

Dixon AFG. 2005. Insect Herbivore–Host Dynamics: Tree-Dwelling Aphids [M]. Cambridge: Cambridge University Press, 18-42.

Ferris GF. 1950. Report upon scale insects collected in China (Homoptera: Cocoidea). Part II [J]. *Microent*, 15(3): 69-97.

Foldi I. 1997. Defense strategies in scale insects: phylogenetic inference and evolutionary scenarios (Hemiptera: Coccoidea). In Grandcolas P (ed.), The origin of biodiversity in insects: phylogenetic tests of evolutionary scenarios [M]. Paris: Memoires Musee National Histoire Naturelle, 203-230.

Forbes AR. 1966. Electron microscope evidence for nerves in the mandibular stylets of the green peach aphid (*Myzus persicae*) [j]. *Nature*, 212: 726.

Gullan PJ, Kosztarab M. 1997. Adaptations in scale insects [J]. *Annu Rev Entomol*, 42: 23-50.

Heriot AD. 1934. The renewal and replacement of the stylets of sucking insects during each stadium, and the method of penetration [J]. *Can J Res*, 11(5): 602-612.

Koteja J. 1974. On the phylogeny and classification of the scale insects (Homoptera, Coccinea)(discussion based on the morphology of the mouthparts) [J]. *Acta Zool Cracov*, 19: 267-325.

Koteja J. 1985. Essay on the prehistory of the scale insects (Homoptera, Coccinea) [J]. *Ann Zool (Warsaw)*, 38: 321–328.

Kuwana I. 1923. The Chinese white-wax scale, *Ericerus pela* Chavannes [J]. *Philippine J Sci*, 22(4): 393-405.

Le Rü B, Renard S, Allo MR, Le LJ, Rolland JP. 1995. Morphology and ultrastructure of sensory receptors of the labium of the cassava mealybug, *Phenacoccus manihoti* Matile-Ferrero (Homoptera, Pseudococcidae) [J]. *Entomol Exp Appl*, 77(1): 31-36.

Leopold RA, Freeman TP, Buckner JS, Nelson DR. 2003. Mouthpart morphology and stylet penetration of host plants by the glassy-winged sharpshooter, *Homalodisca coagulata*(Homoptera: Cicadellidae) [J]. *Arthropod Struct Dev*, 32(2-3): 189-199.

Miles PW. 1968. Insect secretions in plants [J]. *Annu Rev Phytopathol*, 6: 137-164.

Miles PW. 1972. The saliva of Hemiptera [J]. *Adv Insect Physiol*, 9: 183-255.

Miles PW. 1999. Aphid saliva [J]. *Biol Rev*, 74(1): 41–85.

Pesson P. 1944. Contribution à l'étude morphologique et fonctionnelle de la tête, de l'appareil buccal et du tube digestif des femelles de coccides [M]. Paris: Imprimerie Nationale, 1-260.

Pollard DG. 1973. Plant penetration by feeding aphids (Hemiptera: Aphidoidea): a review [J]. *Bull Entomol Res*, 62(4): 631-714.

Powell G, Tosh CR, Hardie J. 2006. Host plant selection by Aphids: Behavioral, Evolutionary and Applied Perspectives [J]. *Annu Rev Entomol*, 51: 309-330.

Rani PU, Madhavendra SS. 2005. External morphology of antennal and rostral sensillae in four hemipteran insects and their possible role in host plant selection [J]. *Int J Trop Insect Sci*, 25(3): 198-207.

Rosell RC, Lichty JE, Brown JJ. 1995. Ultrastructure of the mouthparts of adult sweetpotato whitefly, *Bemisia tabaci* Gennadius (Homoptera: Aleyrodidae) [J]. *Int J Insect Morphol Embryol*, 24(3): 297-306.

Sasaki C. 1904. On the wax-producing coccid, *Ericerus pe-la*, Westwood [M]. The bulletin of the College of Agriculture, Tokyo Imperial University, 6:1-14.

Schoonhoven LM, van Loon JJA, Dicke M. 2005. Insect-plant biology(Second Edition) [M]. Oxford: Oxford University Press, 29-47.

Snodgrass RE. 1935. Principles of insect morphology [M]. New York: McGraw-Hill Company, 265-277.

Speight M, Nicol M. 1984. Horse chestnut scale - a new urban menace? [J]. *New Sci*, 101(1404): 40-42.

Tjallingii WF. 1978. Mechanoreceptors of the aphid labium [J]. *Entomol Exp Appl*, 24(3): 731–737.

Uzest M, Gargani D, Dombrovsky A, Cazevieille C, Cot D, Blanc S. 2010. The "acrostyle": A newly described anatomical structure in aphid stylets [J]. *Arthropod Struct Dev*, 39:221-229.

Walling LL. 2008. Avoiding effective defenses: strategies employed by phloem-feeding insects [J]. *Plant Physiol*, 146(3): 859–866.

Wang ZL, Chen Y, Chen XM, Wang SY, Zhao JJ. 2008. Color preference and active regularity of the parasite wasps of *Ericerus pela*. Acta [J]. *Zool Res*, 29(6): 661-666. [王自力, 陈勇, 陈晓鸣, 王绍云, 赵杰军. 2008. 白蜡虫寄生蜂对颜色的选择性及活动规律 [J]. 动物学研究, 29(6): 661-666.]

Wensler RJ. 1977. The Fine Structure of Distal Receptors on the Labium of the Aphid, *Brevicoryne brassicae* L. (Homoptera): Implications for Current Theories of Sensory Transduction [J]. *Cell Tissue Res*, 181(3): 409-422.

Yano M. 1915. White wax coccid (*Ericerus pela* CHAV.) [M]. Bulletin of forest experiment station, Meguro, Tokyo, 143-150.

Zhao LQ, Dai W, Zhang CN, Zhang YL. 2010. Morphological characterization of the mouthparts of the vector leafhopper *Psammotettix striatus* (L.) (Hemiptera:Cicadellidae) [J]. *Micron*, 41(7): 754-759.

动　物　学　研　究　2012，Oct. 33(5): 455−462　　CN 53-1040/Q　ISSN 0254-5853
Zoological Research　　DOI：10.3724/SP.J.1141.2012.05455

鸡 mir-17-92 基因簇的结构、功能及其调控

闫晓红，王志鹏，王　宁*

(东北农业大学动物科学技术学院 农业部鸡遗传育种重点实验室，哈尔滨　150030)

摘要：mir-17-92 基因簇(mir-17-92 cluster)是脊椎动物的一个保守 miRNA 基因簇，在哺乳动物细胞增殖、分化、凋亡及发育等多种生物学过程中起重要的调控作用。同时，mir-17-92 基因簇又是一个癌基因，在多种肿瘤中表达。尽管对 mir-17-92 基因簇的研究非常广泛，但其作用机制还不完全清楚。鸡 mir-17-92 基因簇的结构组成特点、功能及其作用机制尚未见研究报道。该文根据同一 miRNA 基因簇的 miRNAs 在功能上相关的特点，以鸡 mir-17-92 基因簇序列为研究对象，采用生物信息学研究方法和手段，开展了鸡 mir-17-92 基因簇的基因组结构、miRNAs 序列组成、靶生物学过程和信号通路以及 miRNAs 结合位点分布特点等分析研究。结果发现，鸡 mir-17-92 基因簇调控 MAPK、Wnt 和 TGF-β 等多个重要细胞信号通路；miRNA 结合位点分布分析显示，该 miRNA 基因簇多个成员共同作用于同一个靶基因，提示该基因簇的 miRNAs 成员以组合和协同的方式调控靶基因。该研究为深入了解 mir-17-92 基因簇如何调控癌症和发育中的关键细胞过程奠定了基础。

关键词：鸡；mir-17-92 基因簇；细胞信号通路；功能；调控
中图分类号：Q959.725; Q343　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**0254-5853-(2012)05-0455-08

Characterization of the structure, function and regulation of the chicken mir-17-92 cluster

YAN Xiao-Hong, WANG Zhi-Peng, WANG Ning*

(*Key Laboratory of Chicken Genetics and Breeding, Ministry of Agriculture, College of Animal Science and Technology, Northeast Agricultural University, Harbin* 150030, *China*)

Abstract: The miRNA cluster mir-17-92 is conserved in vertebrates and plays crucial roles in cell proliferation, differentiation, apoptosis and animal development. The mir-17-92 cluster also acts as an oncogene that is expressed in variety of cancers. Despite extensive study, the molecular mechanism underlying its functions is not fully understood. The fact that miRNAs in the same cluster are functionally related was used in the present study to investigate the function, and regulation of the chicken mir-17-92 cluster with GO analysis, pathway analysis, and binding site distribution analysis. The investigation found that the chicken mir-17-92 cluster regulated several vital cellular signaling pathways, including the MAPK, Wnt and TGF-β signaling pathway. A miRNA binding site distribution analysis found that multiple miRNAs within the mir-17-92 cluster targeted the same genes, suggesting that the miRNA members of the mir-17-92 cluster act synergetically to regulate target genes. This study paves the way for future investigation into how the mir-17-92 cluster may regulate key cellular processes involved in cancer and development.

Key words: Chicken; mir-17-92 cluster; Cell signaling pathway; Function; regulation

微 RNA(miRNA)是长度约为 22 nt 的非编码 RNA 分子，是一类重要的转录后调控因子(Zhang & Su, 2009)，广泛地存在于动物、植物及微生物中。miRNA 生成的阻断研究表明，miRNA 在个体发育、细胞增殖、分化及凋亡等多种生命活动中发挥重要作用(Inui et al, 2010)。miRNA 的调控异常会导致疾病和癌症的发生(Ventura et al, 2008)。miRNA 基因在染色体上的分布并不是随机的，许多 miRNA 基因常紧密相邻，形成 miRNA 基因簇(miRNA cluster)。miRNA cluster 往往由一个共同的启动子调

收稿日期：2012-04-11；接受日期：2012-08-17
基金项目：国家重点基础研究发展计划(2009CB941604)；国家自然科学基金项目(30972086)
*通信作者(Corresponding author)，博士，教授，博导，E-mail：ningwang2001@yahoo.com
第一作者简介：闫晓红，硕士，讲师，E-mail：yanxiaohong@neau.edu.cn

控，转录产生一个多顺反子的前体转录本，前体转录本经过 Drosha 酶和 Dicer 酶加工，产生多个成熟的 miRNAs。mir-17-92 cluster 是人、鼠等脊椎动物中一个保守的 miRNA cluster(Tanzer & Stadler, 2004)，具有 6 个串联排列的 miRNAs 前体，可产生 miR-17-5p、miR-17-3p、miR-18a、miR-19a、miR-20a、miR-19b 和 miR-92 等至少 7 个成熟 miRNA 分子(Wang et al, 2008)。mir-17-92 cluster 敲除小鼠的研究表明,它是哺乳动物生长发育所必需的，mir-17-92 cluster 敲除鼠出生后很快死亡，并伴有心脏、肺等发育缺陷(de Pontual et al, 2011; Ventura et al, 2008)；肺脏过表达 mir-17-92 cluster 会导致转基因鼠死亡，转基因鼠肺脏出现细胞增殖增强，而肺上皮细胞分化下降(Lu et al, 2007)。mir-17-92 cluster 的功能多种多样，可调控细胞增殖、分化、凋亡及血管再生等生物学过程(Zhang et al, 2009)，其具体生物学功能取决于细胞类型和发育阶段等。目前已知 mir-17-92 cluster 在 B 细胞发育、肺祖细胞增殖和分化、脂肪细胞分化及血管发生等中发挥重要作用(Wang et al, 2008; Lu et al, 2007)。mir-17-92 cluster 是目前公认的第一个非编码癌基因(oncomir-1)，现已发现 mir-17-92 cluster 在肺癌、B 细胞淋巴瘤、淋巴瘤、肝癌、膀胱癌、结肠癌、前列腺癌、胃癌及胰腺癌等多种肿瘤细胞中高表达(Lu et al, 2007; Olive et al, 2010)，而且，在淋巴瘤、肺癌等多种癌细胞中均存在 mir-17-92 cluster 基因扩增现象(Ota et al, 2004)。mir-17-92 cluster 和原癌基因 *c-Myc* 在癌症发生中具有协同作用，过表达 mir-17-92 cluster 能促进原癌基因 *c-Myc* 诱导的淋巴瘤发生(O'Donnell et al, 2005; Tagawa et al, 2007)，而敲除该基因簇能够在体外降低肿瘤细胞的生长，在体内能降低 Myc 的致瘤作用，但这种作用可被重新导入 mir-17-92 cluster 所恢复(Mu et al, 2009)。

生物信息学分析和实验都已证实，同一 miRNA 基因簇的 miRNAs 在功能上是相关的(Yuan et al, 2009; Kim et al, 2009)。miRNA 通过其靶基因发挥作用，但是，通过鉴定靶基因揭示 miRNA 在细胞和机体内生长发育过程中的作用及作用机制非常困难。原因一是 miRNA 多以家族形式存在，成员之间功能冗余，遗传分析非常困难；二是单个 miRNA 靶基因众多，靶基因数量可从几百到上千，每一个靶基因又受多个 miRNAs 的调控；三是从基因表达量的变化看, miRNA 对靶基因表达的抑制作用并不大，即使过表达 miRNA，一般它们对内源性靶基因的蛋白表达水平的抑制作用也不超过 50%(Baek et al, 2008)，而在这种情况下，大多蛋白是具有活性的，仍然能正常发挥作用。这说明，虽然每个 miRNA 有许多靶基因，但是，仅一部分靶基因具有明显的生物学作用。相对于单个 miRNA, miRNA cluster 的功能研究难度更大，因为 miRNA cluster 的靶基因数量更多，其作用和作用机制更为复杂。针对 miRNA 功能研究的困境，人们提出了研究 miRNA 的靶生物学过程和信号通路，而不是靶基因的研究策略，认为这可能是一个更好的选择(Inui et al, 2010)。原因是信号分子复合物是一个高度动态、短暂而又非化学配比的复合物，其形成是一个剂量依赖性的反应，而这正是 miRNA 调控的理想靶分子。现在，研究已证实，在动物细胞中，信号通路是 miRNA 调控的首要靶通路(Inui et al, 2010; Avraham & Yarden, 2012)。

mir-17-92 cluster 是一个被广泛研究的 miRNA 基因簇，该 miRNA 基因簇的多个成员的靶基因已得到实验验证，目前，已知的靶基因有 E2F1、E2F2、E2F3、CDKN1A、RB2/P130、TGF-β1、Pten、BIM(Bcl2 interacting mediator of cell death)、cyclin D1、CTGF、Tsp1、MAPK9、MAPK14 及 STAT3 等(Aguda et al, 2008; Carraro et al, 2009; Mu et al, 2009; O'Donnell et al, 2005; Olive et al, 2010; Peter, 2010; Sylvestre et al, 2007; Trompeter et al, 2011; Yu et al, 2008)。尽管 mir-17-92 cluster 的一些靶基因已得到验证，但是，该 miRNA 基因簇参与的生物学过程和通路还远未弄清楚(de Pontual et al, 2011)。我们在鸡前脂肪细胞小 RNA 文库重测序中发现，mir-17-92 cluster 也在鸡前脂肪细胞中表达(Yao et al, 2011)，但目前尚未见鸡 mir-17-92 cluster 的研究报道。为此，我们开展了鸡 mir-17-92 cluster 的基因组结构、miRNAs 序列组成、miRNAs 作用位点分布及其靶生物学过程和信号通路等研究,为下一步实验分析鸡 mir-17-92 cluster 的作用及其作用机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 mir-17-92 基因簇序列

从 miRBase 数据库(http://microrna.sanger.ac.uk/)查询到鸡、人、黑猩猩、大鼠、小鼠、猪、牛、狗、珍珠鸡、非洲蟾蜍、家蝇及斑马鱼等 12 种动物的

mir-17-92 cluster，下载这些物种 mir-17-92 cluster 各 miRNA 的前体序列和成熟序列。

1.2　mir-17-92 基因簇 DNA 序列

通过 UCSC Genome Browser(http://genome.ucsc.edu/)获取这 12 种动物 mir-17-92 cluster 的 DNA 序列和基因组定位信息。

1.3　mir-17-92 基因簇序列的比对分析

利用 ClustalW2.0(http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/)对 12 种动物 mir-17-92 cluster 的 DNA 序列及该基因簇各 miRNA 的前体序列和成熟序列做比对分析。

1.4　鸡 mir-17-92 基因簇的功能分析

以鸡 mir-17-92 cluster(gga-mir-17-92 cluster)为研究对象，通过 TargetScan(http://www.targetscan.org/)、PicTar(http://pictar.mdc-berlin.de/cgi-bin/)和 miRDB(http://mirdb.org/miRDB/)软件，分析 gga-mir-17-92 cluster 各 miRNA 的靶基因。选取至少两款软件都预测到的靶基因作为该 miRNA 基因簇的靶基因，根据同一 miRNA 基因簇的 miRNAs 在功能上相关的特点(Yuan et al, 2009; Kim et al, 2009)，利用 David 数据库(http://david.abcc.ncifcrf.gov/)，分析 gga-mir-17-92 cluster 调控的生物学过程和信号通路。选取三款软件都预测到的靶基因作为 gga-mir-17-92 cluster 的靶基因，进行靶基因的 miRNA 作用位点分布分析。

2　结　果

2.1　鸡 mir-17-92 基因簇的结构分析

查询 miRBase 数据库可知，gga-mir-17-92 cluster 位于鸡 1 号染色体上，其 DNA 序列全长 795 bp。利用 UCSC Genome Browser 确定 gga-mir-17-92 cluster 的各个 miRNA 在染色体上的排列顺序，结果发现，鸡、人和鼠 mir-17-92 cluster 的排列顺序相同(图 1)。目前，已知人等哺乳动物的 mir-17-92 cluster 有两个旁系同源体 mir-106a-363 cluster 和 mir-106b-25 cluster(Ventura et al, 2008)。人 mir-106a-363 cluster 位于 X 染色体，该基因簇的初级转录本称为 Kis2，包含 mir-106a、mir-18b、mir-20b、mir-19b-2、mir-92-2 和 mir-363 等 6 个 miRNA。人 mir-106b-25 cluster 位于 7 号染色体上一个蛋白质编码基因 *MCM7* 的第 13 个内含子内，包含 mir-106b、mir-93 和 mir-25 等 3 个 miRNA。利用 UCSC 数据库的 BLAT，发现鸡基因组序列上仅有一个 gga-mir-17-92 cluster 的旁系同源体 gga-mir-106-20b cluster，它位于鸡 4 号染色体上，包含 mir-106、mir-18b 和 mir-20b 等 3 个 miRNA。鸡 mir-17-92 cluster 的旁系同源体与人等哺乳动物该基因簇的旁系同源体的构成不同，说明人、鼠和鸡的 mir-17-92 cluster 的旁系同源体的产生机制不同，gga-mir-106-20b cluster 可能是鸡特异性的。

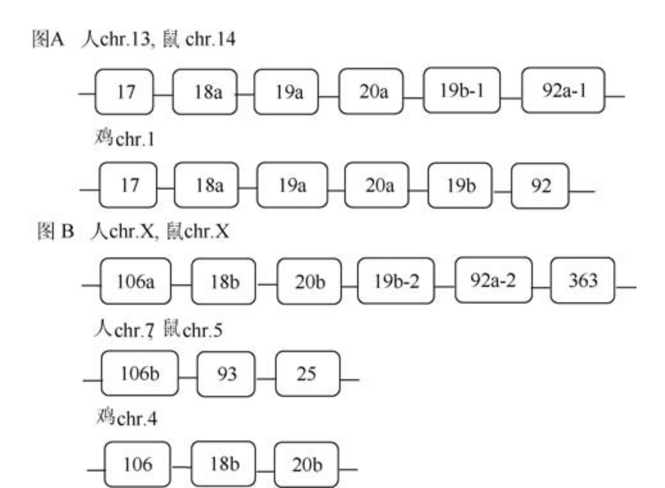


图 1　人、鼠和鸡 mir-17-92 基因簇(图 A)及其旁系同源体(图 B)的结构组成

Fig. 1　Schematic representation of the mir-17-92 cluster (A) and their paralogs (B) in human, mouse and chicken

方框内数字或数字与字母的组合代表 mir-17-92 基因簇及其旁系同源体中的相应 microRNA (The numbers or numbers with letter inside the boxes stand for the corresponding microRNAs of the mir-17-92 cluster and their paralogs)。

mir-17-92 cluster 产生的 miRNAs 可以分为 3 个家族，分别为 mir-17 家族、mir-19 家族及 mir-92 家族，其中 mir-17 家族包括 mir-17、mir-18 和 mir-20 (Olive et al, 2010)。对 gga-mir-17-92 cluster 及其旁系同源体 gga-mir-106-20b cluster 的所有前体 miRNAs 做同源性分析，结果发现，mir-17、mir-18a/18b、mir-20a/20b 及 mir-106 是同源序列，均属于 mir-17 家族(RF00051)，mir-19a/19b 是同源序列，属于 mir-19 家族(RF00245)，而 mir-92 属于 mir-92 家族(RF00464)。

2.2　mir-17-92 基因簇的 DNA 序列比较分析

查询 UCSC 数据库，共获上述 12 种动物中 9 种动物(珍珠鸡、狗、家蝇除外)的 mir-17-92 cluster 基因组序列,比较分析发现，不同物种 mir-17-92 cluster 在其染色体上位置不同，但其基因组序列长度相近，约 781~883 bp。9 种动物 mir-17-92 cluster

的 DNA 序列比对结果显示, mir-17-92 cluster 的 DNA 序列组成在各物种间保守性较高, 且呈现物种间进化关系越近, 其 DNA 序列的相似度越高。例如, 人与猪、狗、牛及鼠 mir-17-92 cluster 的 DNA 序列的相似度为 89%~97%; 鸡和热带爪蟾间的相似度为 79%, 而鸡和热带爪蟾与人等哺乳动物间的相似度则都在 50%左右。

2.3 mir-17-92 基因簇的 miRNAs 前体序列和成熟序列分析

已获取的 12 种动物 mir-17-92 基因簇的各 miRNA 前体序列(pre-miRNA)的比对分析显示, 鸡与珍珠鸡除了 mir-19a 的同源性为 92%, mir-92a 同源性为 95%外, 其他相对应 pre-miRNA 序列的同源性均为 100%。同时还发现, mir-17、mir-18a、mir-19a、mir-20a 及 mir-92a 的 pre-miRNA 序列在这 12 种动物中的保守性均高于 mir-19b 的保守性(表 1); 而 mir-19b pre-miRNA 序列的保守性相对较低, 主要是由于斑马鱼与其他物种间的差异略大, 12 种动物的 mir-19b pre-miRNA 序列间的相似度在 70%~86%。但进一步分析发现, mir-19b pre-miRNA 序列的差异主要发生在前体序列中成熟序列以外的区域, 而 12 种动物 mir-19b 的成熟序列仍高度保守。

鸡 mir-17-92 基因簇能产生 7 种成熟 miRNAs, 即 gga-miR-17-3p(MIMAT0001115)、gga-miR-17-5p (MIMAT0001114)、gga-miR-18a(MIMAT0001113)、gga-miR-19a(MIMAT0001112) 、 gga-miR-19b (MIMAT0001110)、gga-miR-20a(MIMAT0001111)和 gga-miR-92(MIMAT0001109)。这些成熟 miRNA 序列的比对分析显示, mir-19 家族的 miR-19a 和 miR-19b 的序列相似度很高, 达 95%。mir-17 家族中, miR-17-5p 与 miR-20a 的序列相似度最高, 为 91%, 其次是 miR-20a 与 miR-18a, 为 81%; 而 miR-17-3p 与 miR-17-5p 的序列相似度较低, 仅有 55%。mir-17 家族、mir-19 家族及 mir-92 家族间各 miRNA 成熟序列间的相似度都不高, 在 47%~63%之间(表 2)。

miRNA 成熟序列 5'端的第 2~8 位碱基序列组成被誉为"种子序列(seed sequence)", 种子序列是 miRNA 与靶基因 mRNA 的 3'UTR 结合所必需的。比较鸡 mir-17-92 cluster 及其旁系同源体 gga-mir-106-20b cluster 的各个成熟 miRNA 的种子序列组成可见, 同属于 mir-17 家族, miR-17-3p 独自具有种子序列 CUGCAGU; 而 miR-18a/18b 的种子序列完全相同, 为 AAGGUGC; miR-17-5p、miR-20a/20b 和 miR-106 的种子序列完全相同, 为 AAAGUGC。mir-19 家族的 miR-19a/19b 的种子序列也完全相同, 是 GUGCAAA; 属于 miR-92 家族的 miR-92 的种子序列是 AUUGCAC(图 2)。

表 1 12 种动物 mir-17-92 基因簇的 6 种前体 miRNA 序列比对结果

Tab. 1 Multiple sequence alignments of 6 pre-miRNAs of the mir-17-92 cluster from 12 different animals (%)

鸡 *Gallus gallus*	珍珠鸡 *Taeniopygia guttata*	人 *Homo sapiens*	黑猩猩 *Pan troglodytes*	牛 *Bos taurus*	猪 *Sus scrofa*	狗 *Canis familiaris*	大鼠 *Rattus norvegicus*	小鼠 *Mus musculus*	家蝇 *Monodelphis domestica*	非洲爪蟾 *Xenopus tropicalis*	斑马鱼 *Danio rerio*
mir-17	100	94	94	94	92	94	88	91	94	96	85
mir-18a	100	98	98	100	98	100	97	97	98	84	86
mir-19a	92	97	97	97	97	98	95	96	97	95	90
mir-19b	100	95	95	95	96	96	93	93	95	86	77
mir-20a	100	94	94	94	94	91	88	89	91	83	84
mir-92a	95	94	94	94	94	94	91	91	93	84	85

表 2 鸡 mir-17-92 基因簇各 miRNA 成员成熟序列的比对结果

Tab. 2 Multiple sequence alignments of miRNA members of the chicken mir-17-92 cluster (%)

鸡 miRNA Chicken miRNA	gga-miR-19b	gga-miR-19a	gga-miR-20a	gga-miR-17-3p	gga-miR-18a	gga-miR-17-5p
gga-miR-92	57	19	28	40	47	42
gga-miR-19b		95	47	45	59	47
gga-miR-19a			47	45	63	43
gga-miR-20a				60	81	91
gga-miR-17-3p					45	55
gga-miR-18a						72

gga-miR-106　A**AAAGUGC**UUACAGUGCAGGUA　22
gga-miR-17-5p　C**AAAGUGC**UUACAGUGCAGGUAGU　24
gga-miR-20a　U**AAAGUGC**UUAUAGUGCAGGUAG　23
gga-miR-20b　C**AAAGUGC**UCAUAGUGCAGGUAG　23

gga-miR-18b　U**AAGGUGC**AUCUAGUGCAGUUA　22
gga-miR-18a　U**AAGGUGC**AUCUAGUGCAGAUA　22

gga-miR-17-3p　A**CUGCAGU**GAAGGCA-CUUGU　20

gga-miR-19b　U**GUGCAAA**UCCAUGCAAAACUGA　23
gga-miR-19a　U**GUGCAAA**UCUAUGCAAAACUGA　23

gga-miR-92　U**AUUGCAC**UUGUCCCGGCCUG　21

图 2　鸡 mir-17-92 基因簇及其旁系同源体 mir-106-20b 基因簇中各 miRNA 种子序列比较

Fig. 2　Comparison of miRNA seed sequences of chicken mir-17-92 cluster and its paralog mir-106-20b

阴影粗体部分表示种子序列(Seed sequences are in bold)。

2.4　鸡 mir-17-92 基因簇的靶生物学过程和信号通路分析

为揭示鸡 mir-17-92 cluster 的作用及其作用机制，我们首先预测了该基因簇中各 miRNA 的靶基因，基于同一 miRNA 基因簇的 miRNAs 在功能上相关的特性(Yuan et al, 2009; Kim et al, 2009)，合并整个 mir-17-92 cluster 的靶基因，进而分析该 miRNA 基因簇所调控的生物学过程和信号通路。我们利用 TargetScan、PicTar 和 miRDB 软件，分别获得 gga-mir-17-92 cluster 7 个 miRNAs 的靶基因，共计 4421 个。为降低靶基因的假阳性率，选取至少两款软件能预测到的靶基因作为 gga-mir-17-92 cluster 的靶基因，共获 522 个基因。将这 522 个基因递交 DAVID 数据库，过滤后得到 476 个基因，进而利用 DAVID(Background：Gallus)对这 476 个靶基因做 GO(Gene Ontology)分析、功能聚类分析(Functional annotation clustering)、KEGG Pathway 和 Panther Pathway 分析。

2.4.1　鸡 mir-17-92 基因簇靶基因的 GO 分析和功能聚类分析　GO 分析显示，476 个基因中，与生物过程有关的基因(GOTERM_BP_FAT)222 个，占 46.6%；与分子功能有关的基因(GOTERM_MF_FAT)281 个，占 59.0%；与细胞组件有关的基因(GOTERM_CC_FAT)126 个，占 26.5%。对参与生物过程的 222 个基因作进一步分析(Thresholds: Count=5, EASE=0.05)，结果发现，参与生物过程的基因主要富集于 RNA 代谢、转录调控、信号转导、蛋白磷酸化及修饰等,其中 RNA 代谢、转录调控是许多 miRNA 常见的靶生物学过程(Glazov et al, 2008)，鸡 mir-17-92 cluster 作用的独特之处是调控信号传导和蛋白修饰。

DAVID 功能聚类分析结果显示(Classification Stringency: Highest)，476 个基因存在 60 个富集簇，其中，分值不低于 1(enrichment score≥1)的簇有 16 个。分值最高的是细胞黏附蛋白 Cadherin 家族富集簇(InterPro 蛋白结构域富集)，其次是依赖于修饰的大分子降解过程(GO 生物学过程富集)、核糖核苷酸结合功能(GO 分子功能富集)、脂类分子结合区(uniprot database,蛋白序列特征富集)、金属离子结合功能(GO 分子功能富集)、转录负调控(GO 生物学过程富集)以及大分子合成的负调控(GO 生物学过程富集)等富集簇(表 3)。

表 3　基因功能聚类分析

Tab. 3　Gene functional annotation clustering analysis

Annotation cluster 富集簇	Enrichment score 富集簇分值	Count 基因数	*P* Value *P* 值
Annotation Cluster 1	Enrichment Score: 4.8		
INTERPRO	Cadherin, N-terminal	10	2.9E-8
Annotation Cluster 2	Enrichment Score: 3.41		
GOTERM_BP_FAT	modification-dependent macromolecule catabolic process	15	1.5E-4
Annotation Cluster 3	Enrichment Score: 3.38		
GOTERM_MF_FAT	ribonucleotide binding	68	2.7E-4
Annotation Cluster 4	Enrichment Score: 3.11		
UP_SEQ_FEATURE	lipid moiety-binding region:S-geranylgeranyl cysteine	6	9.2E-5
Annotation Cluster 5	Enrichment Score: 2.5		
GOTERM_MF_FAT	metal ion binding	95	2.3E-3
Annotation Cluster 6	Enrichment Score: 2.45		
GOTERM_BP_FAT	negative regulation of transcription	13	1.6E-3
Annotation Cluster 7	Enrichment Score: 2.43		
GOTERM_MF_FAT	GTP binding	19	3.3E-3
Annotation Cluster 8	Enrichment Score: 2.39		
GOTERM_BP_FAT	negative regulation of macromolecule biosynthetic process	14	3.2E-3

2.4.2 鸡mir-17-92基因簇靶基因的KEGG Pathway和Panther Pathway分析 KEGG通路富集分析显示(Thresholds:count=5, EASE=0.05), 476个靶基因中, 121个基因参与KEGG代谢通路, 占25.4%。7个具有显著性的KEGG代谢通路(P<0.05)分别是MAPK信号通路(19个基因)、Wnt信号通路(11个基因)、TGF-β 信号通路(8 个基因)、泛素介导的蛋白降解通路(12个基因)、内吞作用通路(13个基因)、黏着斑通路(12个基因)和卵母细胞减数分裂通路(8个基因)(表4)。

Panther pathway 分析显示(Thresholds:count=2, EASE=0.1), 476个靶基因中, 33个基因参与2个显著的富集通路(P<0.05), 分别是Wnt信号通路(20个基因)和cadherin信号通路(13个基因)。另外, 还有8个基因参与TGF-β 信号通路(P<0.1)(表4)。

表4 鸡mir-17-92基因簇靶基因的通路分析

Tab. 4 Pathways analysis of target genes of the chicken mir-17-92 cluster

信号通路 Pathway term	靶基因数 Count[1]	百分率 %[2]	P值 P Value
KEGG通路 KEGG pathway			
MAPK信号通路 MAPK signaling pathway	19	4.0	4.8E-4
泛素介导的蛋白降解通路 Ubiquitin mediated proteolysis	12	2.5	2.9E-3
内吞作用通路 Endocytosis	13	2.7	1.4E-2
Wnt信号通路 Wnt signaling pathway	11	2.3	1.6E-2
TGF-β信号通路 TGF-β signaling pathway	8	1.7	1.7E-2
黏着斑通路 Focal adhesion	12	2.5	4.6E-2
卵母细胞减数分离通路 Oocyte meiosis	8	1.7	4.8E-2
Panther 通路 Panther pathway			
Wnt信号通路 Wnt signaling pathway	20	4.2	3.7E-4
Cadherin信号通路 Cadherin signaling pathway	13	2.7	4.0E-3
TGF-β信号通路 TGF-β signaling pathway	8	1.7	9.1E-2

[1] 参与该代谢途径的靶基因数(Numbers of involved genes); [2] 参与该代谢途径的靶基因数除以基因总数(Numbers of involved genes/Numbers of total genes)。

2.5 鸡mir-17-92 cluster的miRNAs结合位点分布分析

miRNA 通过其种子序列与靶基因 mRNA 3'UTR 区碱基互补来调控靶基因的表达。靶基因mRNA 3'UTR区具有多个miRNA的结合位点, 同时受多个miRNA的调控, 这些miRNA存在组合和协同作用(Yan & Wang, 2010)。靶基因 3′UTR 的miRNA结合位点分布能揭示miRNA之间的组合和协同作用。为此, 我们选取三款软件(TargetScan、PicTar 及 miRDB)都能预测到的 gga-mir-17-92 cluster 靶基因进行鸡mir-17-92基因簇miRNAs结合位点分析, 共获 138 个靶基因。这其中, 至少两款软件预测由相同 mirRNA 调控的靶基因有 136个。136个靶基因中, 受到gga-mir-17-92 cluster中1 个 miRNA 调控的基因仅有 22 个, 主要受miR-17-5p, 或miR-17-3p, 或miR-18a, 或miR-20a调控; 受2个miRNA调控的基因有91个, 主要受mir-19a和mir-19b, 或mir-17-5p和mir-20a的调控; 受 3 个 miRNA 调控的基因有 9 个, 主要受miR-17-5p/17-3p/18a/20a/92与miR-19a和miR-19b调控, 或受miR-17-3p、miR-17-5p和miR-20a的调控; 受4个mirRNA调控的基因有14个, 主要受miR-17-5p、miR-20a、miR-19a和miR-19b的调控。这提示gga-mir-17-92 cluster在调控靶基因时, 该基因簇 miRNA 成员之间存在组合和协同作用。由于鸡 mir-17-92 cluster 的 mir-17 家族(mir-17-5p 和mir-20a)和mir-19家族(mir-19a和mir-19b)内成员的同源性很高, 尤其是它们的种子序列组成完全相同(图2), 因此, 该miRNA基因簇中同家族的这些种子序列完全相同的miRNAs的结合位点相同且它们的靶基因绝大多数是相同的。另外, 该miRNA基因簇不同家族成员还存在结合位点的部分重叠(mir-17家族和mir-19家族)现象(图3, 图4), 这说明 mir-17-92 基因簇成员存在功能冗余现象。事实上, 已有研究报道mir-17-92基因簇的mir-17家族和 mir-19 家族成员协同调控 *Pten* 基因(Xiao et al, 2008)。

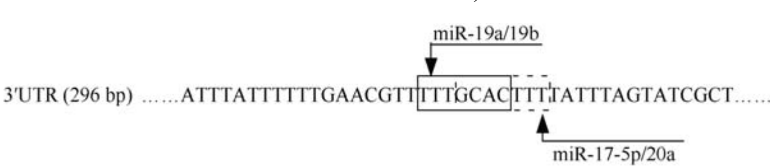


图3 mir-17-92基因簇在BMPR2基因3′UTR的结合位点图示

Fig. 3 The binding site distribution of mir-17-92 cluster miRNAs in the 3′UTR of BMPR2 gene

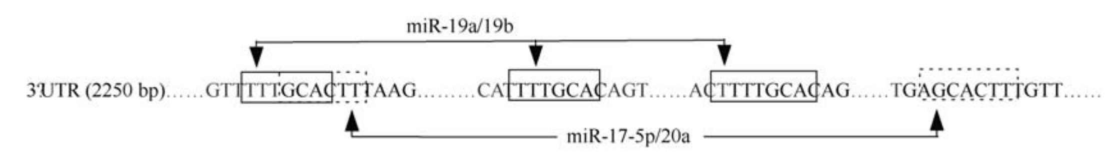


图 4　mir-17-92 基因簇在 ZNF238 基因 3′UTR 的结合位点图示
Fig. 4　The binding site distribution of mir-17-92 cluster miRNAs in the 3′UTR of ZNF238 gene

3　讨　论

mir-17-92 cluster 是一个在脊椎动物非常保守的 miRNA 基因簇，这提示该 miRNA 基因簇在动物生长发育过程中发挥重要作用。实验也已证明，敲除 mir-17-92 cluster 会导致动物发育异常(de Pontual et al, 2011)，其表达异常会导致疾病(肿瘤)的发生(Olive et al, 2010)。鸡 mir-17-92 cluster 靶基因的 GO 分析显示，该 miRNA 基因簇除了参与 RNA 代谢、转录调控外，还调控信号转导。进一步的 KEGG 和 Panther 通路分析显示，该 miRNA 基因簇调控多个重要的信号通路。KEGG 通路富集分析显示，鸡 mir-17-92 cluster 靶基因富集于 MAPK 信号通路、泛素介导的蛋白降解通路、内吞作用通路、Wnt 信号通路、TGF-β 信号通路、黏着斑通路和卵母细胞减数分裂通路。Panther 通路富集分析同样发现，该 miRNA 基因簇靶基因富集于 TGF-β 信号通路和 Wnt 信号通路。事实上，近年研究已发现，多个 miRNA 参与 MAPK 信号通路、TGF-β 信号通路、Notch 信号通路、Wnt 信号通路以及 Hh 信号通路等的调控(Avraham & Yarden, 2012; Hagen & Lai, 2008)。MAPK 信号通路是 KEGG 通路分析中富集靶基因最多、P 值最小的通路(P=4.8×10^{-4})。MAPK 信号通路也是细胞最为广泛存在的信号传导通路之一，可以被许多细胞因子激活，从而调控细胞生长、发育、分化和凋亡等许多生理学过程，特别是细胞周期的调控。与我们的分析结果相一致，哺乳动物实验研究已证实 mir-17-92 cluster 调控细胞周期、促进细胞增殖并抑制细胞凋亡(Lu et al, 2007; Wang et al, 2008)。多个已鉴定的 mir-17-92 cluster 靶基因，如 E2F、E2F2、E2F3、CDKN1A 和 Rbl2 等都是细胞周期的调控因子，这些靶基因主要是 MAPK 信号通路的下游基因；而靶基因 MAPK9 和 MAPK14 则是 MAPK 信号通路的上游分子(Carraro et al, 2009; Trompeter et al, 2011)。综合本研究结果可知，鸡 mir-17-92 cluster 可在不同层面调控 MAPK 信号通路。泛素介导的蛋白降解通路在细胞许多基本生命活动中发挥重要作用，它调控细胞周期、细胞分化、信号通路及机体发育等(Ciechanover et al, 2000)。通过泛素介导的蛋白降解通路，鸡 mir-17-92 cluster 不仅直接调控细胞增殖和分化等，而且可以通过该通路调控其他信号通路活性，决定通路激活时间、信号强度以及持续时间，并协调细胞内不同信号通路。Wnt 信号通路和 TGF-β 通路是鸡 mir-17-92 cluster 的另两个富集信号通路，实验已证实 mir-17-92 cluster 调控经典 Wnt 信号通路的靶基因 Cyclin D1(Yu et al, 2008), mir-17-92 cluster 是 TGF-β 信号通路的强抑制剂，它可在多个层面调控该信号通路(Li et al, 2011; Mestdagh et al, 2010)。Cadherin 是一个大的糖蛋白家族，参与细胞间的黏附，这类蛋白对于组织结构和生长发育非常重要(Carraro et al, 2009; Derycke & Bracke, 2004)。DAVID 功能富集分析显示，cadherin 蛋白是靶基因的第一富集簇，Panther pathway 通路分析显示，鸡 mir-17-92 cluster 的靶基因富集于 cadherin 信号通路(P<0.05)；而 KEGG 分析发现该基因簇靶基因富集于局部黏着斑通路(P<0.05)，这些分析结果都提示，mir-17-92 cluster 调控细胞的黏附。已有实验证实 mir-17-92 cluster 参与细胞黏附的调控(Carraro et al, 2009; Mestdagh et al, 2010)。

由上述讨论分析可见，我们对 mir-17-92 cluster 的靶生物学过程和通路分析结果是可靠的。从通路分析结果看，鸡 mir-17-92 cluster 可在生物学过程和信号通路的多个层面发挥调控作用，但是，目前对 mir-17-92 cluster 的了解还不是很充分，仅仅鉴定了少量的靶基因，许多层面的调控还有待于实验研究证实，而这些研究的开展将有望全面揭示 mir-17-92 cluster 的生理和病理作用及其致癌机制，并为相关肿瘤的防治提供依据。

鸡 mir-17-92 cluster 的调控分析表明， 该基因簇成员可以协同调控同一个靶基因，并且可以在不同层面调控同一信号通路。这种功能冗余现象具有重要的生物学意义，这是一种防出错机制(fail-safe mechanism)，可确保细胞和机体的基因表达、生长及发育的精细调控，保证细胞不出错，或即使出错也不至于有大的影响。另外，尽管 miRNA 的调控作

用小, 但是这种 miRNA 基因簇的多个成员共同作用于一个信号通路的不同基因和同一个基因, 就会起到放大其调控作用的目的。

鸡 mir-17-92 cluster 的保守性及其靶生物学过程和信号传导通路的分析提示, 该 miRNA 基因簇在鸡的细胞增殖、分化、凋亡及生长发育过程中发挥着十分重要作用。下一步我们将针对鸡 mir-17-92 cluster 所调控的生物学过程和信号通路, 重点分析它在鸡脂肪细胞增殖和分化中的作用以及作用机制, 这将有助于揭示鸡脂肪生长发育的分子调控机制, 并将为优质低脂肉鸡的分子育种奠定理论基础。

参考文献:

Aguda BD, Kim Y, Piper-Hunter MG, Friedman A, Marsh CB. 2008. MicroRNA regulation of a cancer network: consequences of the feedback loops involving miR-17-92, E2F, and Myc[J]. *Proc Natl Acad Sci USA,* **105**(50): 19678-19683.

Avraham R, Yarden Y. 2012. Regulation of signalling by microRNAs[J]. *Biochem Soc Trans,* **40**(1): 26-30.

Baek D, Villén J, Shin C, Camargo FD, Gygi SP, Bartel DP. 2008. The impact of microRNAs on protein output[J]. *Nature,* **455**(7209): 64-71.

Carraro G, El-Hashash A, Guidolin D, Tiozzo C, Turcatel G, Young BM, De Langhe SP, Bellusci S, Shi W, Parnigotto PP, Warburton D. 2009. miR-17 family of microRNAs controls FGF10-mediated embryonic lung epithelial branching morphogenesis through MAPK14 and STAT3 regulation of E-Cadherin distribution[J]. *Dev Biol,* **333**(2): 238-250.

Ciechanover A, Orian A, Schwartz AL. 2000. Ubiquitin-mediated proteolysis: biological regulation via destruction[J]. *Bioessays,* **22**(5): 442-451.

de Pontual L, Yao E, Callier P, Faivre L, Drouin V, Cariou S, Van Haeringen A, Geneviève D, Goldenberg A, Oufadem M, Manouvrier S, Munnich A, Vidigal JA, Vekemans M, Lyonnet S, Henrion-Caude A, Ventura A, Amiel J. 2011. Germline deletion of the miR-17-92 cluster causes skeletal and growth defects in humans[J]. *Nat Genet,* **43**(10): 1026-1030.

Derycke LDM, Bracke ME. 2004. N-cadherin in the spotlight of cell-cell adhesion, differentiation, embryogenesis, invasion and signaling[J]. *Int J Dev Biol,* **48**(5-6): 463-476.

Glazov EA, McWilliam S, Barris WC, Dalrymple BP. 2008. Origin, evolution, and biological role of miRNA cluster in DLK-DIO3 genomic region in placental mammals[J]. *Mol Biol Evol,* **25**(5): 939-948.

Hagen JW, Lai EC. 2008. microRNA control of cell-cell signaling during development and disease[J]. *Cell Cycle,* **7**(15): 2327-2332.

Inui M, Martello G, Piccolo S. 2010. MicroRNA control of signal transduction[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol,* **11**(4): 252-263.

Kim YK, Yu J, Han TS, Park SY, Namkoong B, Kim DH, Hur K, Yoo MW, Lee HJ, Yang HK, Kim VN. 2009. Functional links between clustered microRNAs: suppression of cell-cycle inhibitors by microRNA clusters in gastric cancer[J]. *Nucleic Acids Res,* **37**(5): 1672-1681.

Li L, Shi JY, Zhu GQ, Shi B. 2011. MiR-17-92 cluster regulates cell proliferation and collagen synthesis by targeting TGFB pathway in mouse palatal mesenchymal cells[J]. *J Cell Biochem,* **113**(4): 1235-1244.

Lu Y, Thomson JM, Wong HY, Hammond SM, Hogan BL. 2007. Transgenic over-expression of the microRNA miR-17-92 cluster promotes proliferation and inhibits differentiation of lung epithelial progenitor cells[J]. *Dev Biol,* **310**(2): 442-453.

Mestdagh P, Boström AK, Impens F, Fredlund E, Van Peer G, De Antonellis P, von Stedingk K, Ghesquière B, Schulte S, Dews M, Thomas-Tikhonenko A, Schulte JH, Zollo M, Schramm A, Gevaert K, Axelson H, Speleman F, Vandesompele J. 2010. The miR-17-92 microRNA cluster regulates multiple components of the TGF-β pathway in neuroblastoma[J]. *Mol Cell,* **40**(5): 762-773.

Mu P, Han YC, Betel D, Yao E, Squatrito M, Ogrodowski P, de Stanchina E, D'Andrea A, Sander C, Ventura A. 2009. Genetic dissection of the miR-17-92 cluster of microRNAs in Myc-induced B-cell lymphomas[J]. *Genes Dev,* **23**(24): 2806-2811.

O'Donnell KA, Wentzel EA, Zeller KI, Dang CV, Mendell JT. 2005. c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression[J]. *Nature,* **435**(7043): 839-843.

Olive V, Jiang I, He L. 2010. *mir-17-92*, a cluster of miRNAs in the midst of the cancer network[J]. *Int J Biochem Cell Biol,* **42**(8): 1348-1354.

Ota A, Tagawa H, Karnan S, Tsuzuki S, Karpas A, Kira S, Yoshida Y, Seto M. 2004. Identification and characterization of a novel gene, *C13orf25*, as a target for 13q31-q32 amplification in malignant lymphoma[J]. *Cancer Res,* **64**(9): 3087-3095.

Peter ME. 2010. Targeting of mRNAs by multiple miRNAs: the next step[J]. *Oncogene,* **29**(15): 2161-2164.

Sylvestre Y, De Guire V, Querido E, Mukhopadhyay UK, Bourdeau V, Major F, Ferbeyre G, Chartrand P. 2007. An E2F/miR-20a autoregulatory feedback loop[J]. *J Biol Chem,* **282**(4): 2135-2143.

Tagawa H, Karube K, Tsuzuki S, Ohshima K, Seto M. 2007. Synergistic action of the microRNA-17 polycistron and Myc in aggressive cancer development[J]. *Cancer Sci,* **98**(9): 1482-1490.

Tanzer A, Stadler PF. 2004. Molecular evolution of a microRNA cluster[J]. *J Mol Biol,* **339**(2): 327-335.

Trompeter H I, Abbad H, Iwaniuk K M, Hafner M, Renwick N, Tuschl T, Schira J, Müller HW, Wernet P. 2011. MicroRNAs MiR-17, MiR-20a, and MiR-106b act in concert to modulate E2F activity on cell cycle arrest during neuronal lineage differentiation of USSC[J]. *PLoS One,* **6**(1): e16138.

Ventura A, Young AG, Winslow MM, Lintault L, Meissner A, Erkeland SJ, Newman J, Bronson RT, Crowley D, Stone JR, Jaenisch R, Sharp PA, Jacks T. 2008. Targeted deletion reveals essential and overlapping functions of the *miR-17~92* family of miRNA clusters[J]. *Cell,* **132**(5): 875-886.

Wang Q, Li YC, Wang JH, Kong J, Qi YC, Quigg RJ, Li XM. 2008. miR-17-92 cluster accelerates adipocyte differentiation by negatively regulating tumor-suppressor Rb2/p130[J]. *Proc Natl Acad Sci USA,* **105**(8): 2889-2894.

Xiao CC, Srinivasan L, Calado DP, Patterson HC, Zhang BC, Wang J, Henderson JM, Kutok JL, Rajewsky K. 2008. Lymphoproliferative disease and autoimmunity in mice with increased miR-17-92 expression in lymphocytes[J]. *Nat Immunol,* **9**(4): 405-414.

Yan XH, Wang N. 2010. Connections and differences between gene expression regulated by transcription factors and MicroRNAs[J]. *Chn J Biochem Mol Biol*, **26**(10): 892-897. [闫晓红, 王宁. 2010. 转录因子与 microRNA 在基因表达调控中的功能联系及差异. 中国生物化学与分子生物学报, **26**(10): 892-897.]

Yao J, Wang YX, Wang WS, Wang N, Li H. 2011. Solexa sequencing analysis of chicken pre-adipocyte microRNAs[J]. *Biosci Biotechnol Biochem,* **75**(1): 54-61.

Yu ZR, Wang CG, Wang M, Li ZP, Casimiro MC, Liu MR, Wu KM, Whittle J, Ju XM, Hyslop T, McCue P, Pestell RG. 2008. A cyclin D1/microRNA 17/20 regulatory feedback loop in control of breast cancer cell proliferation[J]. *J Cell Biol,* **182**(3): 509-517.

Yuan XY, Liu CN, Yang PC, He SM, Liao Q, Kang SL, Zhao Y. 2009. Clustered microRNAs' coordination in regulating protein-protein interaction network[J]. *BMC Syst Biol,* **3**: 65.

Zhang R, Su B. 2009. Small but influential: the role of microRNAs on gene regulatory network and 3'UTR evolution[J]. *J Genet Genomics,* **36**(1): 1-6.

Zhang ZW, An Y, Teng CB. 2009. The roles of miR-17-92 cluster in mammal development and tumorigenesis[J]. *Hereditas*, **31**(11): 1094-1100. [张振武, 安洋, 滕春波. 2009. miR-17-92 基因簇 microRNAs 对哺乳动物器官发育及肿瘤发生的调控. 遗传, **31**(11): 1094-1100.

动　物　学　研　究　2012，Oct. 33(5): 463−472　　CN 53-1040/Q　ISSN 0254-5853
Zoological Research　　DOI：10.3724/SP.J.1141.2012.05463

鲫属鱼类 DNA 条码及种与亚种划分

程　磊[1,2]，常玉梅[1]，鲁翠云[1,2]，曹顶臣[1]，孙效文[1,*]

(1. 中国水产科学研究院黑龙江水产研究所 农业部淡水水产生物技术与遗传育种重点实验室, 黑龙江 哈尔滨　150070;
2. 上海海洋大学 水产与生命学院, 上海　201306)

摘要：鲫属(*Carassius*)鱼类由于表型变异大, 分布范围广, 分类一直不完善。该属常被分为三个种：黑鲫(*C. carassius*)、白鲫(*C. cuvieri*)和鲫(*C. auratus*)。 鲫又可分为多个亚种(包括金鱼), 其中银鲫(*C. auratus gibelio*)亚种有时被视作一个独立的种。该文研究了线粒体细胞色素 c 氧化酶亚基 I (*COI*)基因 5'端 651 bp 的片段在这些种和亚种（共计 128 尾标本）中的变异。结果表明，*C. carassius*、 *C. cuvieri* 和 *C. auratus* 均为有效种, 同时欧亚大陆的与日本列岛的 *C. auratus* 有明显分化；而 *C. auratus gibelio* 和 *C. auratus auratus* 有一些共享的单倍型, *C. auratus gibelio* 应被视为 *C. auratus* 的一个亚种, 而不是一个有效物种。由于 *C. auratus auratus* 和 *C. auratus gibelio* 等类群中同时存在二倍体和三倍体, 因此，倍性不宜作为种或亚种的划分标准。

关键词：鲫属; DNA 条码; *COI* 基因; 物种鉴定; 银鲫
中图分类号：Q349; Q959.468.09　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：0254-5853-(2012)05-0463-10

DNA barcoding and species and subspecies classification within genus *Carassius*

CHENG Lei[1,2], CHANG Yu-Mei[1], LU Cui-Yun[1], CAO Ding-Cheng[1], SUN Xiao-Wen[1,*]

(1. *Key Laboratory of Aquatic Freshwater Aquatic Biotechnology and Breeding*, *Ministry of Agriculture of China*, *Heilongjiang Fisheries Research Institute*, *Chinese Academy of Fishery Sciences*, *Harbin*　150070, *China*;
2. *College of Fisheries and Life Science*, *Shanghai Ocean University*, *Shanghai*　201306, *China*)

Abstract: The classification of *Carassius* has not been well established due to its great variability and wide distribution. Usually, *Carassius* is identified as three species: *C. carassius*, *C. cuvieri* and *C. auratus*, the latter including several subspecies, such as goldfish. Out of these subspecies, *C. auratus gibelio* have recently been thought of as a valid species of *Carassius.* In this study we collected the 5′end 651 bp segments of the mitochondrial cytochrome *c* oxidase I (*COI*) gene from 128 specimens, including *C. carassius*, *C. cuvieri*, *C. auratus auratus*, *C. auratus gibelio* and *C. auratus langsdorfii*. All three species of *Carassius* (*C. carassius*, *C. cuvieri*, *C. auratus*) were found to be valid, meanwhile genetic differentiation between the Eurasian *C. auratus* and Japanese *C. auratus* has reached a high level. However, several haplotypes were shared between *C. auratus auratus* and *C. auratus gibelio*. Consequently, *C. auratus gibelio* should be regarded as a subspecies of *C. auratus* rather than a valid species. Moreover, because both diploids and triploids exist in *C. auratus auratus* and *C. auratus gibelio*, ploidy level should not be used as criteria for the classification of species or subspecies in *Carassius*.

Key words: *Carassius*; DNA barcode; *COI* gene; Species identification; *C. auratus gibelio*

鲫属(*Carassius*)鱼类广泛分布于欧亚大陆, 更是东亚地区淡水水体中的常见鱼类。鲫鱼是我国重要的淡水经济鱼类之一, 我国目前年产食用鲫鱼约 200 万吨(Gui, 2007)。从鲫鱼中选育出的金鱼(goldfish), 具有异常丰富的表型变异, 其驯化和变异的遗传基础是遗传学家关心的课题之一(Chen, 1959; Komiyama et al, 2009; Wang, 2007)。鲫(*C. auratus*)中不仅有两性生殖的二倍体, 也有行雌核

收稿日期：2012-01-05；接受日期：2012-08-23
基金项目：中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(201109)；农业部引进国际先进农业科学技术计划(“948”, 2011-G12)；国家重点基础研究发展计划(“973”, 290CB126305)；公益性行业(农业)科研专项(200903045)
*通信作者(Corresponding author)，E-mail: sunxw2002@163.com
第一作者简介：程磊(1982 一)，男，博士，E-mail: chenglei1982@126.com

发育生殖的三倍体和四倍体, 特别是这些雌核发育多倍体中有一定比例的可育雄性个体(Fan & Shen 1990; Gui & Zhou，2010; Xiao et al, 2011)。以上特性使得鲫成为研究脊椎动物性别决定机制和生殖方式调控机制的良好模型(Gui & Zhou，2010)。因此, 鲫属鱼类不仅具有重要的生态和经济价值, 其生物学特性也日益引起生物学家的关注。

我国鱼类学家认为中国大陆鲫属鱼类可以划分为鲫 (*C. auratus*)和黑鲫 (*C. carassius*)两种, 前者又可以分为鲫 (*C. auratus auratus*)指名亚种和银鲫 (*C. auratus gibelio*)亚种(Chen & Huang, 1982; Luo & Yue, 2000)。由于采样的局限性, 我国学者并未研究日本列岛及其周边的鲫鱼分类。日本学者则将日本的鲫鱼分为鲫 (*C. auratus*)与白鲫 (*C. cuvieri*)两种, 前者又被分为 5 个亚种：*C. auratus* subsp. 1、*C. auratus* subsp. 2、*C. auratus grandoculis*、*C. auratus buergeri* 和 *C. auratus. langsdorfii* (Hosoya, 2002)。白鲫 (*C. cuvieri*)早期被认为是鲫 (*C. auratus*)的一个亚种, 后来由于分子证据支持了其单系性, 被认定为一个独立的种(Murakami et al, 2001)。

由于鲫属鱼类的地理分布广, 表型变异大, 染色体倍性和生殖方式复杂, 其分类一直没有得到很好的解决(Ren et al, 2002; Takada et al, 2010)。例如, 由于中国和日本的雌核发育多倍体鲫鱼最初分别是在银鲫 (*C. auratus gibelio*) (Gui, 2007; Shen et al, 1997)和关东鲫 (*C. auratus langsdorfii*) (Kobayasi, 1971; Kobayasi et al, 1970)中发现的, 后来学者们习惯上将中国和日本的雌核发育多倍体鲫鱼分别视为银鲫(Gui, 2007; Shen et al, 1997)和关东鲫(Hosoya, 2002; Ohara et al, 1999, 2000)。但是近年的研究发现多倍体在遗传上可能更接近同域的二倍体而不是异域的多倍体(Apalikova et al, 2008; Brykov et al, 2002; Murakami et al, 2001; Takada et al, 2010), 将银鲫和关东鲫等同于多倍体的观点值得商榷；而且即使将银鲫和关东鲫等同于雌核发育多倍体, 中国多倍体与日本多倍体间的关系也有待厘正。又如, 虽然日本的 *C. auratus* 鉴定作为 5 个亚种, 但是这些亚种似乎并不是单系群(monophyletic group) (Takada et al, 2010; Yamamoto et al, 2010)。我国学者倾向将银鲫视为鲫的一个亚种(Chen & Huang, 1982; Luo & Yue, 2000), 然而，近年来国外学者更多的是将其视为一个有效种(Halacka et al, 2003; Liousia et al, 2008; Öezuluğ et al, 2004)。鲫属鱼类, 特别是鲫(*C. auratus auratus*)指名亚种和银鲫(*C. auratus gibelio*)亚种的形态鉴别较为困难。本文取样时，严格按照《中国鲤科鱼类志》(Chen & Huang, 1982)、《中国动物志•硬骨鱼纲 •鲤形目 •下卷》)(Luo & Yue, 2000)的检索标准加以甄别。

加拿大 Guelph 大学的 Hebert 教授于 2003 年首次提出通过对一个标准基因的 DNA 序列分析, 作为一种新的物种鉴定手段，即 DNA 条形码(Hebert et al, 2003a)。许多研究已经证实了线粒体细胞色素 c 氧化酶亚基 I(cytochrome *c* oxidase subunit I, *COI*)靠近 5′端的一段约 650 bp 序列作为 DNA 条码识别鱼类物种的有效性(Ward et al, 2005, 2008, 2009)。本研究通过对鲫属鱼类线粒体 *COI* 基因部分序列的对比分析, 研究了 *COI* 基因在鲫属鱼类种间及种内的序列变异, 据此探讨了鲫属鱼类种与亚种的划分。日本学者认为金鱼可能起源于中国的银鲫(*C. auratus gibelio*) (Komiyama et al, 2009)。银鲫(*C. auratus gibelio*)主要分布于长城以北, 我国鱼类遗传学者习惯上将其等同于雌核发育多倍体鲫鱼。金鱼是有性生殖二倍体, 历史文献记载应起源于南宋时期杭州一带(Chen, 1959；Wang, 2007)。因此, 金鱼起源于银鲫的观点值得商榷。本文采集了少量彩鲫样品, 结合公共数据库中金鱼、红鲫的资料(见“材料和方法”部分), 同时探讨了观赏鲫鱼的分类地位。

1 材料和方法

1.1 研究样品

本研究共用到 128 尾样品, 研究中用到的各个样品的采集时间、地点、倍性、序列的 GenBank 登录号和标本号整理见表 1。样品有如下 3 个来源：(1)本研究采集的中国大陆鲫属鱼类 *C. carassius* 、*C. auratus auratus*、*C. auratus gibelio* 等种与亚种, 共计 46 个体, 部分实验样品的倍性经流式细胞仪检测, 倍型检测参考 Geng & Sun (2008)的方法。每个个体取鳍条组织固定，保存在 95%的酒精中, 供提取基因组总 DNA 之用。(2) Barcode of Life Data (BOLD) 数据库中的能公开下载到的 76 条鲫属鱼类DNA条形码(截至2011年12月21日)。(3) BOLD 数据库中保存的 *C. cuvier* 和 *C. auratus langsdorfii* 等种与亚种序列较少。由于 *C. cuvier*、*C. auratus langsdorfii* 等种与亚种主要分布在国外, 不便采集样品。GenBank 中保存的能下载到的 *C. cuvier* (GenBank 登录号：AB045144、HQ536316~HQ536

表 1　本研究所用样本信息
Tab. 1　Detail specimen information

学名 Scientific name	标本 Specimen	倍性 Ploidy level	采集时间地点 Sampling time & locality	GenBank 登录号 GenBank Accession No.	单倍型 Haplotypes
C. carassius	XJJ24	N/A	2009 年 11 月新疆阿勒泰	JQ319108	H2
C. carassius	XJJ25	N/A	2009 年 11 月新疆阿勒泰	JQ319109	H2
C. carassius	XJJ26	N/A	2009 年 11 月新疆阿勒泰	JQ319110	H2
C. carassius	XJJ28	N/A	2009 年 11 月新疆阿勒泰	JQ319111	H2
C. auratus gibelio	FZ02	3n	2008 年 9 月黑龙江双凤水库	JQ319082	H8
C. auratus gibelio	FZ39	3n	2008 年 9 月黑龙江双凤水库	JQ319088	H8
C. auratus gibelio	FZ41	3n	2008 年 9 月黑龙江双凤水库	JQ319089	H8
C. auratus gibelio	FZ43	3n	2008 年 9 月黑龙江双凤水库	JQ319090	H8
C. auratus gibelio	FZ44	3n	2008 年 9 月黑龙江双凤水库	JQ319091	H8
C. auratus gibelio	FZ75	2n	2008 年 9 月黑龙江双凤水库	JQ319098	H8
C. auratus gibelio	FZ83	2n	2008 年 9 月黑龙江双凤水库	JQ319099	H8
C. auratus gibelio	FZ10	3n	2008 年 9 月黑龙江双凤水库	JQ319083	H10
C. auratus gibelio	FZ13	3n	2008 年 9 月黑龙江双凤水库	JQ319084	H10
C. auratus gibelio	FZ30	3n	2008 年 9 月黑龙江双凤水库	JQ319085	H10
C. auratus gibelio	FZ31	2n	2008 年 9 月黑龙江双凤水库	JQ319086	H10
C. auratus gibelio	FZ33	3n	2008 年 9 月黑龙江双凤水库	JQ319087	H10
C. auratus gibelio	FZ48	3n	2008 年 9 月黑龙江双凤水库	JQ319092	H10
C. auratus gibelio	FZ49	3n	2008 年 9 月黑龙江双凤水库	JQ319093	H10
C. auratus gibelio	FZ58	3n	2008 年 9 月黑龙江双凤水库	JQ319094	H10
C. auratus gibelio	FZ60	2n	2008 年 9 月黑龙江双凤水库	JQ319095	H10
C. auratus gibelio	FZ61	2n	2008 年 9 月黑龙江双凤水库	JQ319096	H10
C. auratus gibelio	FZ74	2n	2008 年 9 月黑龙江双凤水库	JQ319097	H10
C. auratus gibelio	XQY02	3n	2010 年 7 月黑龙江西泉眼水库	JQ319112	H10
C. auratus gibelio	XQY12	2n	2010 年 7 月黑龙江西泉眼水库	JQ319113	H16
C. auratus gibelio	XQY24	2n	2010 年 7 月黑龙江西泉眼水库	JQ319114	H10
C. auratus gibelio	XQY28	3n	2010 年 7 月黑龙江西泉眼水库	JQ319115	H10
C. auratus auratus	CJ16	2n	2010 年 10 月黑龙江水产研究所	JQ319079	H14
C. auratus auratus	CJ18	2n	2010 年 10 月黑龙江水产研究所	JQ319081	H14
C. auratus auratus	CJ17	2n	2010 年 10 月黑龙江水产研究所	JQ319080	H15
C. auratus auratus	BJ01	N/A	2010 年 10 月北京通州	JQ319070	H16
C. auratus auratus	BJ02	N/A	2010 年 10 月北京通州	JQ319071	H16
C. auratus auratus	BJ03	N/A	2010 年 10 月北京通州	JQ319072	H16
C. auratus auratus	BJX01	N/A	2011 年 4 月北京通州	JQ319073	H16
C. auratus auratus	BJX02	N/A	2011 年 4 月北京通州	JQ319074	H16
C. auratus auratus	BJX03	N/A	2011 年 4 月北京通州	JQ319075	H16
C. auratus auratus	BJX04	N/A	2011 年 4 月北京通州	JQ319076	H16
C. auratus auratus	BJX05	N/A	2011 年 4 月北京通州	JQ319077	H16
C. auratus auratus	BJX06	N/A	2011 年 4 月北京通州	JQ319078	H16
C. auratus auratus	QH01	3n	2009 年 4 月河南安阳	JQ319103	H16
C. auratus auratus	QH08	3n	2009 年 4 月河南安阳	JQ319104	H16
C. auratus auratus	QH09	3n	2009 年 4 月河南安阳	JQ319105	H16
C. auratus auratus	QH11	3n	2009 年 4 月河南安阳	JQ319106	H16
C. auratus auratus	QH15	3n	2009 年 4 月河南安阳	JQ319107	H16

续表

学名 Scientific name	标本 Specimen	倍性 Ploidy level	采集时间地点 Sampling time & locality	GenBank 登录号 GenBank Accession No.	单倍型 Haplotypes
C. auratus auratus	KM01	N/A	2010 年 12 月云南昆明	JQ319100	H16
C. auratus auratus	KM02	N/A	2010 年 12 月云南昆明	JQ319101	H16
C. auratus auratus	KM03	N/A	2010 年 12 月云南昆明	JQ319102	H16
C. carassius	IFCZE084-10	N/A	N/A	HQ960498	H1
C. carassius	IFCZE314-10	N/A	N/A	HQ960715	H2
C. carassius	IFCZE315-10	N/A	N/A	HQ960716	H2
C. carassius	IFCZE316-10	N/A	N/A	HQ960717	H2
C. carassius	IFCZE317-10	N/A	N/A	HQ960718	H2
C. carassius	IFCZE318-10	N/A	N/A	HQ960719	H2
C. carassius	IFCZE644-10	N/A	N/A	HQ961037	H2
C. carassius	IFCZE646-10	N/A	N/A	HQ961038	H2
C. carassius	IFCZE647-10	N/A	N/A	HQ961039	H2
C. carassius	IFCZE648-10	N/A	N/A	HQ961040	H2
C. carassius	IFCZE764-11	N/A	N/A	N/A	H3
C. carassius	IFCZE765-11	N/A	N/A	N/A	H3
C. carassius	IFCZE766-11	N/A	N/A	N/A	H3
C. carassius	IFCZE750-11	N/A	N/A	N/A	H4
C. carassius	IFCZE548-10	N/A	N/A	HQ960942	H5
C. carassius	IFCZE200-10	N/A	N/A	HQ960610	H6
C. carassius	IFCZE742-11	N/A	N/A	N/A	H6
C. cuvieri	GBGC5894-08	N/A	N/A	NC_010768	H7
C. cuvieri	N/A	N/A	N/A	AB045144	H7
C. cuvieri	N/A	N/A	N/A	HQ536316	H7
C. cuvieri	N/A	N/A	N/A	HQ536317	H7
C. cuvieri	N/A	N/A	N/A	HQ536318	H7
C. cuvieri	N/A	N/A	N/A	HQ536319	H7
C. gibelio	IFCZE237-10	N/A	N/A	HQ960643	H8
C. gibelio	IFCZE238-10	N/A	N/A	HQ960644	H8
C. gibelio	IFCZE489-10	N/A	N/A	HQ960884	H8
C. gibelio	GRFRF001-08	N/A	N/A	HQ600703	H9
C. gibelio	IFCZE206-10	N/A	N/A	HQ960616	H9
C. gibelio	IFCZE490-10	N/A	N/A	HQ960885	H9
C. auratus	GBGC7783-09	N/A	N/A	EU266381	H10
C. gibelio	GRFRF002-08	N/A	N/A	HQ600702	H10
C. gibelio	GRFRF003-08	N/A	N/A	HQ600701	H10
C. gibelio	GRFRF051-08	N/A	N/A	HQ600706	H10
C. gibelio	GRFRF053-08	N/A	N/A	HQ600704	H10
C. gibelio	IFCZE085-10	N/A	N/A	HQ960499	H10
C. gibelio	IFCZE144-10	N/A	N/A	HQ960556	H10
C. gibelio	IFCZE207-10	N/A	N/A	HQ960617	H10
C. gibelio	IFCZE236-10	N/A	N/A	HQ960642	H10
C. gibelio	IFCZE334-10	N/A	N/A	HQ960734	H10
C. gibelio	IFCZE335-10	N/A	N/A	HQ960735	H10
C. gibelio	IFCZE336-10	N/A	N/A	HQ960736	H10

续表

学名 Scientific name	标本 Specimen	倍性 Ploidy level	采集时间地点 Sampling time & locality	GenBank 登录号 GenBank Accession No.	单倍型 Haplotypes
C. gibelio	IFCZE337-10	N/A	N/A	HQ960737	H10
C. gibelio	IFCZE456-10	N/A	N/A	HQ960853	H10
C. gibelio	IFCZE457-10	N/A	N/A	HQ960854	H10
C. gibelio	IFCZE458-10	N/A	N/A	HQ960855	H10
C. gibelio	IFCZE488-10	N/A	N/A	HQ960883	H10
C. gibelio	IFCZE570-10	N/A	N/A	HQ960963	H10
C. gibelio	IFCZE571-10	N/A	N/A	HQ960964	H10
C. gibelio	IFCZE642-10	N/A	N/A	HQ961035	H10
C. gibelio	IFCZE643-10	N/A	N/A	HQ961036	H10
C. gibelio	IFCZE698-10	N/A	N/A	HQ961090	H10
C. gibelio	IFCZE844-11	N/A	N/A	N/A	H10
C. gibelio	IFCZE841-11	N/A	N/A	N/A	H11
C. gibelio	GRFRF052-08	N/A	N/A	HQ600705	H12
C. gibelio	GRFRF110-08	N/A	N/A	HQ600699	H12
C. gibelio	GRFRF111-08	N/A	N/A	HQ600698	H12
C. gibelio	GRFRF112-08	N/A	N/A	HQ600697	H12
C. gibelio	GRFRF179-10	N/A	N/A	HQ600700	H12
C. auratus	BCFB735-06	N/A	N/A	EU524450.1	H13
C. auratus	BCFB736-06	N/A	N/A	EU524449.1	H13
C. auratus	BCFB737-06	N/A	N/A	EU524448.1	H13
C. auratus	FOAD213-05	N/A	N/A	EF609306	H13
C. auratus	GBGC0066-06	N/A	N/A	AB111951	H13
C. auratus	GBGC1725-06	N/A	N/A	NC_006580	H13
C. auratus	GBGC6460-09	2n	N/A	AB379921	H13
C. auratus	GBGC6461-09	2n	N/A	AB379920	H13
C. auratus	GBGC6462-09	2n	N/A	AB379919	H13
C. auratus	GBGC6463-09	2n	N/A	AB379918	H13
C. auratus	GBGC6464-09	2n	N/A	AB379917	H13
C. auratus	GBGC6465-09	2n	N/A	AB379916	H13
C. auratus	GBGC6466-09	2n	N/A	AB379915	H13
C. auratus	ACLB017-06	N/A	N/A	HM102292	H13
C. carassius	GBGC1701-06	N/A	N/A	NC_006291	H13
C. gibelio	IFCZE170-10	N/A	N/A	HQ960582	H13
C. gibelio	IFCZE171-10	N/A	N/A	HQ960583	H13
C. gibelio	IFCZE572-10	N/A	N/A	HQ960965	H13
C. auratus	GBGC6459-09	N/A	N/A	AB379922	H16
C. auratus	GBGC1505-06	N/A	N/A	NC_002079	H17
C. langsdorfii	IFCZE726-11	N/A	N/A	N/A	H18
C. langsdorfii	IFCZE827-11	N/A	N/A	N/A	H18
C. langsdorfii	IFCZE831-11	N/A	N/A	N/A	H18
C. auratus langsdorfii	N/A	N/A	N/A	AB006953	H18

AB379915~AB379921 序列来自于金鱼，为 Komiyama et al (2009)递交，据此推测倍性应该是 2n，但未在本研究中检测；公共数据库中下载序列的学名为递交者命名，本文采集样品按照 Chen & Huang (1982)标准分类，公共数据库中的 *C. gibelio* 与 *C. auratus gibelio* 应是同物异名。

AB379915-AB379921 sequences which were submitted by Komiyama et al (2009) were inferred to be from 2n specimens, because they originated from goldfish. However, their ploidy levels were not directedly tested in this study; scientific name of sequences downloaded from public databases were named by submitter; the specimens collected in this study were classified in accordance with criteria of Chen & Huang (1982). In public database, *C. gibelio* and *C. auratus gibelio are* synonyms of gibel carp.

和 *C. auratus langsdorfii* (GenBank 登录号：AB006953)共计 6 条 *COI* 基因序列也被包括在本研究中(截至 2011 年 12 月 21 日)。

1.2 *COI* 基因部分序列扩增及测序

用传统的蛋白酶 K 消化, 酚-氯仿抽提法从鲫鱼鳍条组织中分离、纯化总 DNA。依据鲫鱼线粒体 DNA 序列(GenBank 登录号：AB379922)设计 PCR 扩增的正向引物 *CaCOI*-F (5'-ACCCACCGCCTAAACACTCG-3')和反向引物 *CaCOI*-R (5'-ACTTCTGGGTGACCAAAGAATCA-3')。PCR 反应体系体积 30 μL, 含 30 ng 总 DNA, 1×PCR 缓冲液, 200 μmol/L dNTPs, 引物终浓度各 0.3 μmol/L, 1 U Taq 酶。PCR 反应条件为: 94 ℃预变性 5 min; 94 ℃变性 30 s, 50 ℃退火 30 s, 72 ℃延伸 1 min, 扩增 40 个循环; 最后 72 ℃终延伸 10 min。扩增产物经 1%琼脂糖凝胶电泳检测后, 送生工生物工程(上海)有限公司用正向引物 *CaCOI*-F 测序。

1.3 序列分析

测序得到的 Trace 文件使用 Finch TV v.1.31 (Geospiza, Inc.)软件查看, 转换成 fasta 格式文件供进一步分析用。测序结果编辑后用 NCBI 网站提供的 Barcode Submission Tool 递交到 Genbank 数据库中(GenBank 登录号：JQ319070-JQ319115)。所有序列用 UGENE v.1.95(Unipro, Inc.)软件中的 MUSCLE 软件包(Edgar, 2004)比对。部分公共数据库中的序列, 由于递交者扩增和编辑的方法不同, 在两端有一定的缺失, 这部分差异在使用 DNAsp v.5(Librado and Rozas 2009)统计单倍型时不计入。使用 DNAsp v.5(Librado and Rozas 2009)计算变异位点, 简约信息位点数。使用 MEGA5(Tamura et al, 2011)计算所得单倍型的碱基组成、单倍型间的转换颠换频率比值和基于 Kimura 双参数模型(Kimura 2-parameter, K2P)下各个类群内部的遗传距离及各个类群之间的平均遗传距离, 并用 MEGA5(Tamura et al, 2011)软件中的邻接法(Neighbor-Joining)构建基于 K2P 模型的单倍型进化树, 可靠性经过 1 000 次自展(Bootstrap)检验。研究中选用鲤(*Cyprinus carpio*) *COI* 基因相应片段(GenBank 登录号：JN673560)作为系统进化分析的外类群。

2 结 果

2.1 鲫鱼 *COI* 基因的序列变异

所测序列截取对应于小鼠(*Mus musculus*)*COI* 基因(NC_005089)CDS 区第 52~702 碱基之间的 651 bp 序列。下载序列多数都完整地含有这段序列, 余下少量不完整的序列其长度也在 600 bp 以上。此外, 公共数据库中有两条序列(GenBank 登录号：HQ960610 和 EF609306)各有一个错误的碱基出现, 这两个位点被作为缺失数据处理。BOLD 记录号：IFCZE750-11 序列内部有三碱基的缺失, 这些缺失并不是一个三联体, 理论上会导致 610~621 碱基间的移码突变。查找单倍型时将这些插入缺失(indel)变异排除在外, 共计得到 18 个单倍型, 这些单倍型在各个种和亚种中的分布见表 2。其中单倍型 H1(BOLD 记录号：IFCZE084-10, 无 GenBank 登录号)与其他单倍型的差异十分明显, 经 Blastn 比对发现该序列可能来源于雅罗鱼属(*Leuciscus*), 而不是

表 2 *COI* 基因单倍型在鲫属种或亚种中的分布
Tab. 2 Distribution of *COI* gene haplotypes in different species or subspecies of genus *Carassius*

单倍型 Haplotype	黑鲫 *C. carassius*	白鲫 *C. cuvieri*	鲫/金鱼 *C. auratus auratus*	银鲫 *C. auratus gibelio*	关东鲫 *C. auratus langsdorfii*
H1	1*				
H2	13				
H3	3				
H4	1				
H5	1				
H6	2				
H7		6			
H8				10	
H9				3	
H10			1	36	
H11				1	
H12				5	
H13	1#		14	3	
H14			2		
H15			1		
H16			18	1	
H17					1
H18					4

* BOLD 标本号 IFCZE084-10 的条码序列应来自雅罗鱼属(*Leuciscus*), 而不是鲫属(*Carassius*); # 虽然 Genbank 登录号 NC_006291 序列标明为来源于 *C. carassius*, 但是文献中注明是来源于红鲫鱼(*C. auratus* red var.)(Guo et al, 2007)。

*BOLD specimen record IFCZE084-10 with barcode sequence maybe originated from genus *Leuciscus*, rather than genus *Carassius*; # Genbank accession No NC_006291 sequence was annotated to be origined from *C. carassius* in GenBank, but the origin paper indicated it was from the red crucian carp (Guo et al, 2007).

鲫属(*Carassius*)。余下的 17 个鲫属鱼类的单倍型 A、T、C 和 G 碱基的平均含量为 26.1%、29.0%、28.0% 和 16.9%, A+T 的含量为 55.1%, 明显高于 G+C 的含量 44.9%。17 个单倍型共在 78 位点发生了碱基替换(substitution), 包括 45 个转换(transition)和 8 个颠换(transversion), 有 4 个位点同时存在转换与颠换, 简约信息位点 57 个。17 个单倍型总的平均转换颠换比(Ti/TV, R)为 7.32。*C. auratus langsdorfii* 有两个独享的单倍型(H17, H18), 它与 *C. auratus auratus*、*C.auratus gibelio* 等没有共享的单倍型, 而 *C. auratus auratus* 和 *C.auratus gibelio* 有部分单倍型是共享的(H10、 H13 和 H16)。各个类群内和类群间的平均 K2P 遗传距离见表 3。

2.2　基于 *COI* 基因的鲫鱼系统树

基于 K2P 遗传距离构建的 *COI* 基因单倍型的 NJ 树见图 1。经 Blast 比对发现的可能来源于雅罗鱼属的序列(BOLD 记录号：IFCZE084-10, 无 Genbank 登录号)与其余鲫鱼单倍型的差异甚至超越了鲤属与鲫属间的差异。值得注意的是另一条序列(GenBank 登录号：NC_006291)虽然也标明为来源于 *C. carassius,* 但是却与 *C. auratus* 共享单倍型(H13)。该序列原始文献中注明是来源于红鲫鱼(*C. auratus* red var.)(Guo et al, 2007), 笔者认为这可能是由于作者在将序列递交至 GenBank 过程中对红鲫鱼学名使用错误造成的。除了这两条可能存在人为错误的序列外, 余下鲫鱼属的单倍型在 NJ 树中形成了 5 个主要的分支, 分别对应 *C. carassius*、*C. Cuvieri*、 *C. auratus langsdorfii*、 *C. auratus gibelio* 和 *C. auratus auratus*(图 2)。NJ 树显示 *C. auratus gibelio* 和 *C. auratus auratus* 关系较近, 这两个亚种

表 3　鲫属各类群间平均遗传距离和各个类群内平均遗传距离

Tab. 3　Mean genetic distance between and within each group in genus *Carassius*

类群 Group	类群间平均遗传距离 Between group mean distance				类群内平均遗传距离 Within group mean distance
	C. carassius	*C. cuvieri*	*C. auratus gibelio*	*C. auratus auratus*	
C. carassius					0.007
C. cuvieri	0.071				N/A
C. auratus gibelio	0.066	0.054			0.003
C. auratus auratus	0.063	0.056	0.007		0.004
C. auratus langsdorfii	0.075	0.058	0.038	0.037	0.009

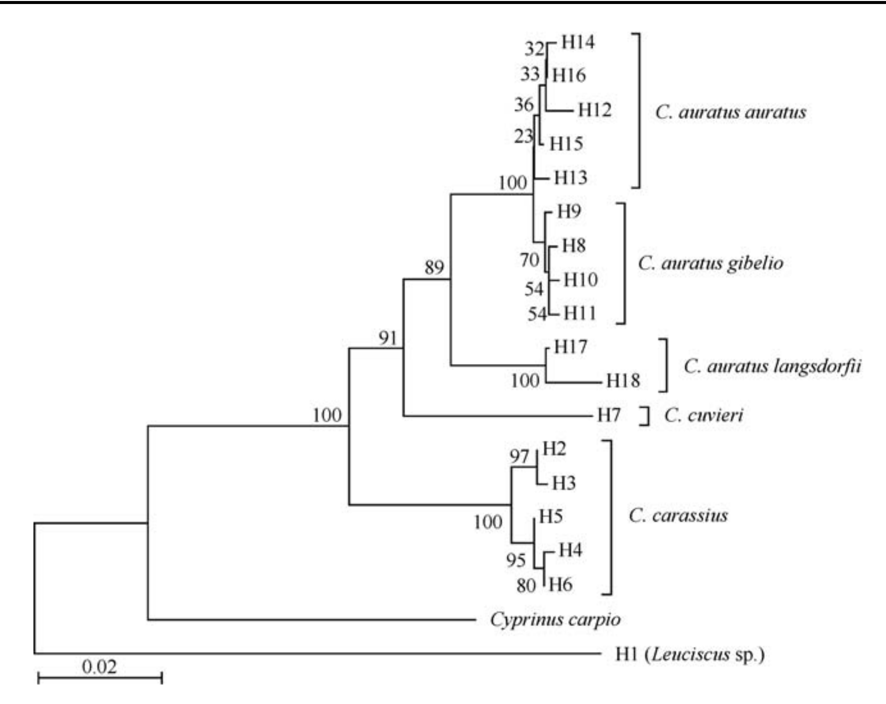


图 1　基于 K2P 遗传距离构建的 *COI* 基因单倍型 NJ 树

Fig. 1　Neighbor-joining tree of *COI* gene haplotypes based on Kimura 2-parameter (K2P)

分布于欧亚大陆, 随后这两个亚种与分布于日本列岛的 *C. auratus langsdorfii* 聚为一支, NJ 树拓扑结构大体与鲫(*C. auratus*)各个亚种的地缘关系一致。NJ 树中白鲫 *C. cuvieri* 和 *C. auratus* 关系更为紧密, 早期有鱼类分类学者认为鲫属只有两个物种 *C. carassius* 和 *C. auratus*, 而 *C. cuvieri* 是 *C. auratus* 的一个亚种。

3 讨 论

3.1 鲫属鱼类的物种有效性

本文从公共数据库中下载得到的 6 条 *C. cuvieri* 序列为同一单倍型(H7), 与其他鲫属鱼类单倍型有显著差异。除了上述可能存在错误的两条标为 *C. carassius* 的序列外, 本研究测定的及从公共数据库中下载的 *C. carassius* 序列聚为一个得到高自展值支持的单系群。这些结果支持应将 *C. cuvieri* 与 *C. carassius* 视为两个独立于 *C. auratus* 之外的有效物种。近年来越来越多的学者习惯将 *C. auratus gibelio* 也视为一个有效种, 一些国外研究报告(Tsoumani et al, 2006; Flajšhans et al, 2008; Leonardos et al, 2008; Liousia et al, 2008)及著名的 Fishbase、NCBI 等网站均接受了这一分类系统, BOLD 系统中也多将银鲫记为 *C. gibelio*(表 1)。传统形态分类一直认为中国鲫鱼可以分为 *C. auratus auratus* 与 *C. auratus gibelio* 两个亚种, 两者的分布区域大体上以长城为界(Chen & Huang, 1982; Ren et al, 2002; Shen et al, 1997)。本研究中我们发现 *C. auratus auratus* 与 *C. auratus gibelio* 的 *COI* 单倍型的也形成两个有较明显分化的分支(图 1), 但是两类群的遗传距离小于 0.01, 并且 *C. auratus auratus* 与 *C. auratus gibelio* 有相当一部分单倍型是共享的(表 2)。它们彼此间的亲缘关系比各自与另外一个来自日本的亚种(*C. auratus langsdorfii*)更近。因此, 本研究基于 DNA 条形码的证据支持将银鲫(*C. auratus gibelio*)视为鲫(*C. auratus*)的一个亚种, 而不是一个独立的有效种。

综上所述, 本研究结果支持将鲫属鱼类分为 3 个物种。黑鲫(*C. carassius*)分布于中亚及欧洲, 也被称为欧鲫, 我国仅见于新疆额尔斯河流域(Chen & Huang, 1982; Ren et al, 2002; Shen et al, 1997), 其背鳍外缘呈凸弧形, 末根硬刺较弱, 而白鲫(*C. cuveri*)和鲫(*C. auratus*)背鳍外缘平直或微内凹, 末根硬刺强。多数文献记载黑鲫(*C. carassius*)鳃耙数在 25~31 之间(Chen & Huang, 1982; Ren et al, 2002), 但《中国动物志 • 硬骨鱼纲 • 鲤形目 • 下卷》中记载其鳃耙数为 30~52(Luo & Yue, 2000)。这可能是排版疏忽造成的, 因为该书的前期工作总结形成的《中国鲤科鱼类志》中记载其鳃耙数为 27~29(Chen & Huang, 1982)。白鲫 (*C. cuveri*)分布范围较窄只限于日本列岛的部分水域, 该种鳃耙密而细长, 数目为 92~130, 据此特征可以与鲫属其他种或亚种区分(Hosoya, 2002)。鲫(*C. auratus*)在东亚有广泛的地理分布(Chen & Huang, 1982; Hosoya, 2002; Ren et al, 2002; Shen et al, 1997), 近年来更入侵到中亚和欧洲的部分水体中(Jakovlić & Gui, 2011; Kalous et al, 2007; Tsoumani et al, 2006; Wheeler, 2000), 其生物学特性复杂，分类也最不完善。

3.2 鲫亚种的划分

东亚的鲫(*C. auratus*)可以分为分化明显的两支, 一支分布于日本列岛；另一支分布于欧亚大陆(Takadab et al, 2010)。本研究中, 日本的 *C. auratus langsdorfii* 与欧亚大陆的 *C. auratus* 样本也明显地分为两支。利用 *COI* 序列有效地进行物种鉴别的基础是该基因种间的遗传变异显著大于种内的遗传变异(Hebert et al, 2003a)。不同生物类群该基因的保守性会有很大的差异, 具体的物种分化阈值应该结合该类群自身的特性决定；但是大量研究表明，物种内的 *COI* 基因的序列分歧很少有大于 2%的, 大部分的种内分歧小于 1% (Hebert et al, 2003b)。本研究中日本的 *C. auratus langsdorfii* 自成一系, 与欧亚大陆的其他 *C. auratus* 样品聚成的支系间的遗传距离大于 0.03, 而各自内部的遗传距离均小于 0.01, 显示日本列岛的 *C. auratus langsdorfii* 与欧亚大陆的其他 *C. auratus* 样品的属于两个不同的线粒体谱系。而且, 日本列岛分布的鲫 *C. auratus* 至少部分亚种在表型上与欧亚大陆的鲫 *C. auratus* 有显著差异, 如 *C. auratus* subsp 1. 背鳍软鳍条 11~14, *C. auratus grandaculis* 鳃耙 51~73(Hayosa, 2002)。当然是否应该将日本列岛的鲫与欧亚大陆的鲫视作两个有效物种还需要形态、解剖、生理、 生态等多方面的证据。

我国分布的鲫 *C. auratus* 其背鳍软鳍条数 15~19, 鳃耙数 37~54, 可以分为两个亚种。*C. auratus auratus* 在我国各个主要水系均有分布, 脊椎骨数 4+26~28, 侧线鳞 27~30, 而 *C. auratus gibelio* 脊椎骨数 4+28~30, 侧线鳞 29~32。*C. auratus*

gibelio 在我国主要分布于黑龙江和额尔齐斯河水系，国外则自欧洲多瑙河至俄罗斯远东地区、朝鲜半岛皆有分布，但是欧洲是否是其自然分布区则有争议(Chen & Huang, 1982; Luo & Yue, 2000; Ren et al, 2002)。本文及前人的研究均发现我国的鲫也存在两支分化比较明显的线粒体谱系：一支分布于中国的北方和俄罗斯，为银鲫(*C. auratus gibelio*)；另一支主要分布于中国的南方(Li & Gui, 2008; Takada et al, 2010)，为鲫指名亚种(*C. auratus auratus*)。

金鱼可能起源于中国的银鲫(Komiyama et al, 2009)，但是随后有学者证明金鱼并非起源于银鲫而是起源于中国鲫鱼的另一个谱系(Rylková et al, 2010)。本研究也包括了金鱼(H13: AB379915~AB379921)(Komiyama et al, 2009)，红鲫(H13, NC_006291)(Guo et al, 2007)和彩鲫(H14:JQ319079, JQ319081; H15: JQ319080)等样品，它们的 *COI* 基因单倍型与鲫指名亚种(*C. auratus auratus*)的相同或相近，而与银鲫(*C. auratus gibelio*)的关系稍远。分子证据支持金鱼起源于中国南方的鲫(*C. auratus auratus*)而不是银鲫(*C. auratus gibelio*)，这也与历史记载相符。自 20 世纪 80 年代以来中国学者陆续在全国多个地方发现了鲫三倍体种群(Gui, 2007; Gui & Zhou 2010)，有学者在研究中习惯将三倍体等同于银鲫(Gui, 2007; Shen et al, 1997)。近年来日本学者也习惯将日本分布的多倍体鲫归为关东鲫(*C. auratus langsdorfii*)(Hosoya, 2002; Ohara et al, 1999, 2000)，但是越来越多的研究发现三倍体鲫在线粒体谱系上更加接近于同域的二倍体(Apalikova et al, 2008; Brykov et al, 2002; Murakami et al, 2001; Takada et al, 2010)。本研究也发现某些单倍型是二倍体与三倍体共享的(表 1)，*C. auratus auratus*，和 *C. auratus gibelio* 中都同时有二倍体和三倍体。因此，倍性也不宜作为种的划分标准，简单的将三倍体视为独立的种或者亚种并不恰当。

致谢：中国水产科学研究院黑龙江水产研究所任慕莲研究员采集了新疆的黑鲫(*C. carassius*)，中国科学院昆明动物研究所陈兵博士采集了昆明的鲫(*C. auratus*)样品，特此致谢！

参考文献：

Apalikova OV, Eliseikina MG, Kovalev MY, Brykov VA. 2008. Collation of data on the ploidy levels and mitochondrial DNA phylogenetic lineages in the silver crucian carp *Carassius auratus gibelio* from Far Eastern and Central Asian populations [J]. *Russ J Gene,* **44**(7): 873-880.

Brykov VA, Polyakova NE, Skurikhina LA, Dolganov SM, Eliseikina MG, Kovalev MY. 2002. Mitochondrial DNA variation in goldfish *Carassius auratus gibelio* from far eastern water reservoirs [J]. *Russ J Gene,* **38**(10): 1176-1180.

Chen XL, Huang HJ. 1982. Cyprininae [M] // Wu XW. Monographs of Cyprinidae in China. Shanghai: Shanghai People's Press. [陈湘粦，黄宏金. 1982. 鲤亚科[M]// 伍献文. 中国鲤科鱼类志. 上海: 上海科学技术出版社, 395-438.]

Chen Z. 1959. The Domestification and Variation of Goldfish [M]. Beijing: Science Press. [陈帧. 1959. 金鱼的家化与变异[M]. 北京: 科学出版社.]

Edgar RC. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput [J]. *Nucleic Acids Res,* **32**(5): 1792-1797.

Fan ZT, Shen JB. 1990. Studies on the evolution of bisexual reproduction in crucian carp (*Carassius auratus gibelio* Bloch) [J]. *Aquaculture,* **84**(3-4): 235-244.

Flajšhans M, Rodina M, Halačka K, Vetešník L, Gela D, Lusková V, Lusk S. 2008. Characteristics of sperm of polyploid Prussian carp *Carassius gibelio* [J]. *J Fish Biol,* **73**(1): 323-328.

Geng B, Sun XW. 2008. The application of Flow cytometry on the DNA content and ploidy analysis of hydrophily organisms [J]. *Chn J Fish,* **21**(2): 21-24. [耿波，孙效文. 2008. 流式细胞术在水生生物 DNA 含量和倍性分析中的应用 [J]. 水产学杂志, **21**(2): 21-24.]

Gui JF. 2007. Partialarity and genetic basis of reproduction mode of gibel carp [M] // Gui JF. Genetic Basis and Artificial Control of Sexuality and Reproduction in Fish. Beijing: Science Press, 107-124. [桂建芳. 2007. 银鲫生殖方式的特殊性及其遗传基础 [M]// 桂建芳. 鱼类性别和生殖的遗传基础及其人工控制. 北京: 科学出版社, 107-124.]

Gui JF, Zhou L. 2010. Genetic basis and breeding application of clonal diversity and dual reproduction modes in polyploid *Carassius auratus gibelio* [J]. *Sci Chn Life Sci,* **53**(4): 409-415.

Guo XH, Liu SJ, Liu Y. 2007. Evidence for maternal inheritance of mitochondrial DNA in allotetraploid [J]. *DNA Seq,* **18**(4): 247-256.

Halacka K, Luskova V, Lusk S. 2003. *Carassius "gibelio"* in fish communities of the Czech Republic [J]. *Ecohydrol Hydrobiol,* **3**(1): 133-138.

Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, de Waard JR. 2003a. Biological identifications through DNA barcodes [J]. *Proc Roy Soc Lond B Biol,* **270**(1512): 313-321.

Hebert PDN, Ratnasingham S, de Waard JR. 2003b. Barcoding animal life: Cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species [J]. *Proc Roy Soc Lond B Bio,* **270**(Suppl 1): S96-S99.

Hosoya K. 2002. Cyprinidae [M] // Nakabo T. Fishes of Japan with Pictorial Keys to the Species. English edn. Tokyo: Tokai University Press, 253-254.

Jakovlić I, Gui JF. 2011. Recent invasion and low level of divergence between diploid and triploid forms of *Carassius auratus* complex in Croatia [J]. *Genetica,* **139**(6): 789-804

Kalous L, Šlechtová V Jr, Bohlen J, Petrtýl M, Švátora M. 2007. First European record of *Carassius langsdorfii* from the Elbe basin [J]. *J Fish Biol,* **70**(Suppl): 132-138.

Kobayasi H. 1971. A cytological study on gynogenesis of the triploid ginbuna (*Carassius auratus langsdorfii*) [J]. *Zool Mag,* **80**: 316-322.

Kobayasi H, Kawashima Y, Takeuchi N. 1970. Comparative chromosome

studies in the genus Carassius, especially with a finding of polyploidy in the ginbuna (*C. auratus langsdorfii*)[J]. *Jpn J Ichthyol,* **17**(4): 153-160.

Komiyama T, Kobayashi H, Tateno Y, Inoko H, Gojobori T, Ikeo K. 2009. An evolutionary origin and selection process of goldfish [J]. *Gene,* **430**(1-2): 5-11.

Leonardos ID, Tsikliras AC, Eleftheriou V, Cladas Y, Kagalou I, Chortatou R, Papigioti O. 2008. Life history characteristics of an invasive cyprinid fish (*Carassius gibelio*) in Chimaditis Lake (northern Greece) [J]. *J Appl Ichthyol,* **24**(2): 213-217.

Li FB, Gui JF. 2008. Clonal diversity and genealogical relationships of gibel carp in four hatcheries [J]. *Anim Genet,* **39**(1): 28-33.

Librado P, Rozas J. 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data [J]. *Bioinformatics,* **25**(11): 1451-1452.

Liousia V, Liasko R, Koutrakis E, Leonardos ID. 2008. Variation in clones of the sperm-dependent parthenogenetic *Carassius gibelio* (Bloch) in Lake Pamvotis (north-west Greece)[J]. *J Fish Biol,* **72**(1): 310-314.

Luo YL, Yue PQ. 2000 Cyprininae [M] // Yue PQ. Fauna Sinica, Osteichthyes, Cypriniformes Ⅲ. Beijing: Science Press, 427-434. [罗云林, 乐佩琦. 2000. 鲤亚科[M]// 乐佩琦. 中国动物志(硬骨鱼纲·鲤形目·下卷). 北京: 科学技术出版社, 427-434.]

Murakami M, Matsuba C, Fujitani H. 2001. The maternal origins of the triploid ginbuna (*Carassius auratus langsdorfi*): phylogenetic relationships within the *C. auratus* taxa by partial mitochondrial D-loop sequencing [J]. *Genes Genet Syst,* **76**(1): 25-32.

Öezuluğ M, Meriç N, Freyhof J. 2004. The distribution of *Carassius gibelio* (Bloch, 1782) (Teleostei: Cyprinidae) in Thrace (Turkey) [J]. *Zool Middle East,* **31**: 63-66.

Ohara K, Ariyoshi T, Sumida E, Sitizyo K, Taniguchi N. 2000. Natural hybridization between diploid crucian carp species and genetic independence of triploid crucian carp elucidated by DNA markers [J]. *Zool Sci,* **17**(3): 357-364.

Ohara K, Dong S, Taniguchi N. 1999. High proportion of heterozygotes in microsatellite DNA loci of wild clonal silver crucian carp, *Carassius langsdorfii* [J]. *Zool Sci,* **16**(6): 909-913.

Ren ML, Guo Y, Zhang RM, Cai LG, Li H, Adak, Fu YL, Liu KL, Zhang XS, Deng GZ. 2002. Fisheries Resources and Fishery of the Ertixhe River in China [M]. Urumqi: Xinjiang Science, Technology and Health Press, 145-162. [任慕莲, 郭焱, 张人铭, 张秀善, 蔡林钢, 李红, 阿达克, 付亚丽, 刘昆仑, 郑贵中. 2002. 中国额尔齐斯河鱼类资源及渔业[M]. 乌鲁木齐: 新疆科技卫生出版社, 145-162.]

Rylková K, Kalous L, Slechtová V, Bohlen J. 2010. Many branches, one root: first evidence for a monophyly of the morphologically highly diverse goldfish (*Carassius auratus*). *Aquaculture,* **302**(1-2): 36-41.

Shen JB, Liu MH, Fan ZT. 1997. Silver Crucian Carp in Amur River [M]. Harbin: Heilongjiang Science and Technology Press. [沈俊宝, 刘明华, 范兆廷. 1997. 黑龙江银鲫 [M]. 哈尔滨: 黑龙江科学技术出版社.]

Takada M, Tachihara K, Kon T, Yamamoto G, Iguchi K, Miya M, Nishida M. 2010. Biogeography and evolution of the *Carassius auratus*-complex in East Asia [J]. *BMC Evol Biol,* **10**(1): 7.

Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods [J]. *Mol Biol Evol,* **28**(10): 2731-2739.

Tsoumani M, Liasko R, Moutsaki P, Kagalou I, Leonardos I. 2006. Length-weight relationships of an invasive cyprinid fish (*Carassius gibelio*) from 12 Greek lakes in relation to their trophic states [J]. *J Appl Ichthyol,* **22**(4): 281-284.

Wang CY. 2007. Variation and Heredity of Goldfish [M]. Beijing: China Agriculture Press. [王春元. 2007. 金鱼的变异与遗传[M]. 北京: 中国农业出版社.]

Ward RD, Hanner R, Hebert PDN. 2009. The campaign to DNA barcode all fishes, FISH-BOL [J]. *J Fish Biol,* **74**(2): 329-356.

Ward RD, Costa FO, Holmes BH, Steinke D. 2008. DNA barcoding of shared fish species from the North Atlantic and Australasia: minimal divergence for most taxa, but *Zeus faber* and *Lepidopus caudatus* each probably constitute two species [J]. *Aquat Biol,* **3**(1): 71-78.

Ward RD, Zemlak TS, Innes BH, Last PR, Hebert PDN. 2005. DNA barcoding Australia's fish species [J]. *Philos Trans R Soc B,* **360**(1462): 1847-1857.

Wheeler A. 2000. Status of the crucian carp, *Carassius carassius* (L.), in the UK [J]. *Fisheries Manag Ecol,* **7**(4): 315-322.

Xiao J, Zou T M, Chen Y B, Chen L, Liu S J, Tao M, Zhang C, Zhao R R, Zhou Y, Long Y, You C P, Yan J P, Liu Y. 2011. Coexistence of diploid, triploid and tetraploid crucian carp (*Carassius auratus*) in natural waters [J]. *BMC Genet,* **12**: e20.

Yamamoto G, Takada M, Iguchi K, Nishida M. 2010. Genetic constitution and phylogenetic relationships of Japanese crucian carps (*Carassius*) [J]. *Ichthyol Res,* **57**(3): 215-222.

动 物 学 研 究 2012，Oct. 33(5): 473−480 CN 53-1040/Q ISSN 0254-5853
Zoological Research DOI：10.3724/SP.J.1141.2012.05473

黄河裸裂尻鱼肌肉生长抑制素基因克隆及表达分析

晁 燕[1], 赵兰英[1], 李长忠[2], 谢保胜[2], 申志新[3], 王国杰[3], 王振刚[3], 李 超[1], 拜彬强[1], 张 辉[1,*], 祁得林[1,*]

(1. 青海大学 农牧学院动物科学系, 西宁 810016; 2. 青海大学 生物科学系, 西宁 810016;
3. 青海省渔业环境监测站, 青海省高原水生生物及生态环境重点实验室, 西宁 810012)

摘要：肌肉生长抑制素 (myostatin, MSTN) 属于转化生长因子 β(TGF-β)超家族中的一个成员, 是骨骼肌生长发育的负调控因子。该文以黄河裸裂尻鱼肌肉总 RNA 为模板, 采用 RT-PCT、5'-RACE 和 3'-RACE 法获得 *MSTN* 基因全长 cDNA 序列为 2 180 bp, 包含长为 1128 bp 的开放阅读框, 编码 375 个氨基酸。以肌肉总 DNA 为模板, 通过 PCR 法进一步获得了 *MSTN* 基因的 2 个内含子序列, 分析表明，黄河裸裂尻鱼 *MSTN* 基因与其他脊椎动物具有相似的基因结构(包括 3 个外显子和 2 个内含子)。黄河裸裂尻鱼 MSTN 具有脊椎动物 MSTN 的共同序列特征, 含有 1 个蛋白酶水解位点 RXXR 和 8 个位于 TGF-β 功能区域保守的半胱氨酸残基。氨基酸序列同源性分析表明, 黄河裸裂尻鱼 MSTN 序列与其他鲤科鱼类 MSTN 具有较高的同源性；而与哺乳动物和禽类的 MSTN 同源性较低。系统发育分析表明, 黄河裸裂尻鱼 MSTN 与其他鲤科鱼类聚于同一进化支。RT-PCR 分析表明, 该基因在黄河裸裂尻鱼 9 个被检组织中均有表达, 但在心、肾、肠、精巢中表达量较高。Real-Time PCR 分析显示, *MSTN* 基因在胚胎中的相对表达量，随胚胎发育阶段的不同而有所差异, 暗示 MSTN 的功能可能并不局限在对肌肉生长发育的负调控作用, 可能还有其他功能。

关键词：黄河裸裂尻鱼; 肌肉生长抑制素; 基因克隆; 表达
中图分类号：Q959.468; Q344.13; Q786 **文献标志码**：A **文章编号**：0254-5853-(2012)05-0473-08

cDNA cloning and expression analysis of *MSTN* gene from *Schizopygopsis pylzovi*

CHAO Yan[1], ZHAO Lan-Ying[1], LI Chang-Zhong[2], XIE Bao-Sheng[2], SHEN Zhi-Xin[3], WANG Guo-Jie[3], WANG Zhen-Gang[3], LI Chao[1], BAI Bin-Qiang[1], ZHANG Hui[1,*], QI De-Lin[1,*]

(1. *Animal Science Department of Agriculture and Animal Husbandry College*, *Qinghai University*, *Xining* 810016, *China*; 2. *Department of Biological Sciences*, *Qinghai University*, *Xining* 810016, *China*; 3. *Key Laboratory for Plateau Aquatic Organism and Environment of Qinghai Province*, *Fishery Environmental Monitoring Station of Qinghai Province*, *Xining* 810012, *China*)

Abstract: Myostatin (MSTN) is a member of the TGF-β superfamily that acts as a negative regulator of skeletal muscle growth. A full-length, 2180 bp, cDNA sequence of the myostatin gene from *Schizopygopisis pylzovi* was cloned with RT-PCR,5'-RACE and 3'-RACE and the cDNA clone included a 1128 bp ORF, encoding a 375 amino acid peptide. Using PCR, we obtained the sequences of two introns of the *MSTN* gene and found that its structure in *Schizopygopsis pylzovi* was similar to that of other vertebrates, including three exons and two introns. Likewise, the putative MSTN peptide of *Schizopygopsis pylzovi* contains a conserved RXXR proteolytic cleavage domain, and 8 conserved cysteine residues in the C terminal of the protein, similar to other vertebrates. Phylogenetic analysis showed that the MSTN of *Schizopygopsis pylzovi* has high homology with other cyprinid fishes, but a low homology with mammals and birds. In the 9 examined tissues, the *MSTN* gene was highly expressed in heart, kidney, intestine and spermary, while weakly expressed in muscle, brain, fat, gill and hepatopancreas. Quantitative real-time PCR analysis showed that the expression of *MSTN* gene was different during embryo development, suggesting that the fish MSTN may not only play roles in muscle development but also contribute to other biological functions.

收稿日期：2012-05-21；接受日期：2012-09-04
基金项目：国家自然科学基金项目(30860048, 31160226)；教育部新世纪优秀人才支持计划(NCET-09-0861)
*通信作者(Corresponding author)，祁得林, 博士, 教授, 研究方向为动物分子遗传与生态学, E-mail: delinqi@126.com; 张辉, 硕士, 教授, 研究方向为动物营养学, E-mail: pzhyp@sina.com
第一作者简介：晁燕(1974−), 在职硕士研究生, 研究方向为动物遗传繁育学, E-mail: chaoyanqh@126.com

Key words: *Schizopygopsis pylzovi*; Myostatin; Gene cloning; Expression

黄河裸裂尻鱼(*Schizopygopsis pylzovi*)隶属鲤形目(Cypriniformes)鲤科(Cyprinidae)裂腹鱼亚科(Schizothoracinae), 广泛分布于青藏高原东北部兰州以上黄河干支流、湖泊、沼泽、柴达木水系以及湟水河水系中(Wu & Wu, 1991)。栖息于水质清澈、水流缓慢、水底多砾石的水域, 通常以浮游动植物或底栖动植物为食料, 在青藏高原淡水生态系统的食物链中具有重要的地位。同其他裂腹鱼亚科鱼类一样, 黄河裸裂尻鱼具有生长期短、生长缓慢、性成熟迟以及繁殖力低等典型生物学特性, 加之受人类活动和环境恶化的影响, 近年来黄河裸裂尻鱼种群数量锐减, 栖息水域明显萎缩(Qi et al, 2007)。目前对黄河裸裂尻鱼的研究主要集中在形态分类、生物学特性、遗传多样性、系统发育和人工繁殖等方面(Wu, 1984; Wu & Wu, 1991; Qi et al, 2007, 2008, 2009, 2012), 而对其功能基因方面的研究仍为匮乏。

肌肉生长抑制素(myostatin, MSTN), 又称GDF-8(growth differentiation factor 8), 是McPherron et al(1997)在小鼠中发现的特异性骨骼肌生长发育负调控因子, 属于转化生长因子β(transforming growth factor β, TGF-β)超家族成员之一。MSTN同TGF-β超家族的其他成员一样, 转录产物先翻译合成前体蛋白, 其中包括N-末端的前肽区、C-末端的成熟肽区和信号肽区等3部分, 在N-末端和C-末端之间有一个蛋白酶解加工位点(RXXR)。成熟肽在被切割后可负向调节肌肉的生长发育, MSTN前肽在骨骼肌中可与MSTN成熟肽结合, 抑制MSTN成熟肽的活性, 促进肌肉的生长。*MSTN*基因过度表达, 将通过下调MyoD、Myogenin mRNA水平和下游的肌酸激酶的活性, 可逆的抑制生肌的过程; 降低*MSTN*的表达水平, 可以提高MyoD家族成员和肌肉肌酸激酶的转录, 从而促进生肌过程(Rios & Cmneiro, 2002)。Reisz-Porszasz et al (2003)的研究证实, *MSTN*过表达的转基因鼠肌肉量和心肌重量降低、肌纤维数量和肌核数量减少, 而*MSTN*基因敲除小鼠骨骼肌比正常野生型小鼠增加2~3倍, 其肌肉细胞增生、肥大, 整个身体的骨骼肌量明显增加, 其胸肌约为野生型小鼠的262%(Patel & Amthor, 2005)。在斑马鱼中, 通过RNAi途径, 给斑马鱼受精卵注射MSTN C-端dsRNA, 导致斑马鱼早期胚胎的增生或肥大(Acosta et al, 2005), 由此可见, MSTN对鱼类肌肉细胞的生长、发育也有着重要的调控作用。

鉴于*MSTN*基因对动物肌肉生长发育的调控作用及其潜在应用价值, 以及黄河裸裂尻鱼的研究现状, 本文对黄河裸裂尻鱼*MSTN*基因特征、结构、组织表达特异性及其在胚胎发育中的相对表达水平进行了初步研究, 旨在为黄河裸裂尻鱼的繁育工作积累科学数据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 样本采集 黄河裸裂尻鱼采集于青海省苏只黄河鱼类增殖站, 用于*MSTN*基因克隆和组织半定量RT-PCR检测。黄河裸裂尻鱼受精卵在水温8.6~14.5 ℃, 溶氧7.8~8.4 mg/L的条件下, 经11 d人工孵化后大量破膜, 积温为158.2 ℃·d。根据胚胎发育特征采集卵裂期、囊胚期、原肠胚期、神经胚期、器官形成期、尾芽期、肌肉效应器、心跳期以及孵化期等主要发育时期的受精卵, 用于检测胚胎不同发育期的*MSTN*基因的表达水平。

1.1.2 试剂 RNAiso Plus、PrimeScript II 1st Strand cDNA Synthesis Kit、5'-Full RACE Kit、3'-Full RACE Core Set Ver.2.0、TaKaRa Agarose Gel DNA Purification Kit Ver.2.0、pMD19-T Vector、*E. coli* Competent Cells JM109、Premix Ex Taq® Version 2.0、PrimeScript® RT reagent Kit (Perfect Real Time)、SYBR® Premix Ex Taq™ (Perfect Real Time)为宝生物工程(大连)有限公司产品, 其他试剂均为进口分装或国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 *MSTN*基因cDNA序列扩增 利用RNAiso Plus提取组织总RNA。cDNA第一链的合成使用PrimeScript II 1st Strand cDNA Synthesis Kit试剂盒, 以黄河裸裂尻鱼肌肉总RNA为模板, Oligo dT为反转录引物, 按试剂盒推荐方法进行操作。根据GenBank登录的斑马鱼(*Danio rerio*, AY323521)、鲤(*Cyprinus carpio*, GQ214770)和南亚野鲮(*Labeo rohita*, GQ332409)的*MSTN*基因序列设计一对引物MSTNF和MSTNR(表1), 用于扩增*MSTN* cDNA核心片段。以肌肉cDNA为模板利用Premix Ex Taq®

Version 2.0 试剂盒进行 PCR 扩增。PCR 扩增程序：94 ℃ 预变性 3 min; 98 ℃变性 10 s, 55 ℃退火 30 s, 72 ℃ 延伸 1 min, 共 35 循环; 最后一循环 72 ℃ 续延伸 5 min。PCR 扩增产物经 1.0%的琼脂糖凝胶电泳后, 用 TaKaRa Agarose Gel DNA Purification Kit Ver.2.0 产物回收试剂盒进行回收纯化, 然后克隆至 pMD19-T 载体中, 转化感受态 *E. coli* Competent Cells JM109, PCR 检测阳性克隆后送生工(上海)生物有限公司进行测序。

根据克隆得到的黄河裸裂尻鱼肌肉 *MSTN* cDNA 核心片段及试剂盒要求分别设计 5'-RACE 嵌套引物 MSTN5A1 和 MSTN5A1, 以及 3'-RACE 嵌套引物 MSTN3A1 和 MSTN3A1(表 1)。RACE 采用 5'-Full RACE Kit 和 3'-Full RACE Core Set Ver.2.0, 按其推荐方法进行, RACE 产物经纯化和克隆后进行测序。

表 1　黄河裸裂尻鱼 *MSTN* 基因克隆及分析引物
Tab. 1　Primers for *MSTN* clone and analysis in *Schizopygopsis pylzovi*

引物名称 Primer	序列(5'— 3') Sequence
MSTNF	GGCTGGGACTGGATTATTG
MSTNR	CCCTCTCTGTTTCTCTTGGAT
MSTN5A1	GAGCAATAATCCAGTCCCAGCCGAA
MSTN5A2	TTATCTCAATGCCCCAGTTGGTCTCCG
MSTN3A1	CTGGACTTGGGAATGGACACTT
MSTN3A2	CCACCCTCCATTATCAGTGCTTTC
MSTNintron1F	TCTCAGCAAACTCCGACTCAAACA
MSTNintron1R	CCGTCCGTAAGAGGCATCAGG
MSTNintron2F	AGCGACCACCGTCTTCTTACAGATA
MSTNintron2R	TTTGGACCCTCCGAGATTTTCAC
MSTNrealF	AATAATCCAGTCCCAGCCGAAG
MSTNrealR	CCCGACCTCACCAAGCACAACA
GAPDHF	TAAGGCAGAAGGCGGCAAGC
GAPDHR	GTGAAAACACCAGTAGACTCCACAACA

1.2.2　基因组 DNA 扩增　采用 Qi et al(2008)的方法提取黄河裸裂尻鱼肌肉组织基因组 DNA。由已发表脊椎动物 *MSTN* 基因序列推测, 黄河裸裂尻鱼 *MSTN* 基因含有 2 个内含子, 在推测的内含子位置两端分别设计特异引物 MSTNintron1F、MSTNintron1R 和 MSTNintron2F、MSTNintron2R (表 1), 以基因组 DNA 为模板扩增两个内含子, 扩增产物经纯化和克隆后进行测序。

1.2.3　半定量 RT-PCR 检测　黄河裸裂尻鱼心脏、肝胰脏、肾、肌肉、脑、脂肪、肠、鳃和精巢共 9 个组织总 RNA 的提取同前, 总 RNA 经 DNase Ⅰ (RNse free) 处理, 平衡其起始浓度后, 分别反转录合成 cDNA 模板(方法同上)。根据拼接获得的 *MSTN* 全长 cDNA 序列, 设计半定量 RT-PCR 和 Real-Time PCR 引物(MSTNrealF 和 MSTNrealR)。用于半定量 RT-PCR 和 Real-Time PCR 的内标 *GAPDH* 基因引物为 GAPDHF 和 GAPDHR(表 1)。以各组织的反转录产物为模板, 利用 MSTNrealF 和 MSTNrealR 为引物进行扩增。PCR 反应体系为 25 μL, PCR 反应程序为：94 ℃, 3 min; 94 ℃ 30 s, 58 ℃ 30 s, 72 ℃ 45 s, 30(*MSTN*)或 25(*GAPDH*)个循环后 72 ℃延伸 5 min。PCR 产物 1.2%琼脂糖凝胶电泳检测并拍照。

1.2.4　Real-Time PCR 法检测胚胎不同发育期的 MSTN 表达水平　根据黄河裸裂尻鱼胚胎不同发育期, 每期取样 3 份, 分别来自 3 个孵化筐。每份样品由 10 枚胚胎组成, 混合在一起提取总 RNA(方法同上), 利用 PrimeScript® RT reagent Kit 试剂盒反转录合成 cDNA 池, 依照 SYBR® Premix Ex Taq™ 试剂盒进行 Real-time PCR 分析。20 μL 反应体系中包括：SYBR® Premix Ex Taq™10 μL、上下游引物(10 μmol/L)个 0.4 μL、cDNA 模板 2.0 μL、ddH$_2$O 7.2 μL。Real-time PCR 时, 每份样品重复 3 次, 结果采用 $2^{-\Delta\Delta ct}$ 法分析。

1.2.5　数据分析　采用 Lasergene 7.0(Burland, 2000)软件对所克隆的基因序列进行阅读框分析、氨基酸序列推定; Blastx 程序(http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) 进行蛋白质相似性搜索; DNAMAN Version 6.0(http://www.lynnon.com)进行氨基酸序列同源性比较; ExPASy - Tools (http://www.expasy.ch/tools/) 对 MSTN 蛋白的生化特性和蛋白质功能位点进行预测和分析; Signal P 4.0 server(http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/) 进行信号肽分析; MEGA3.1(Kumar et al, 2004)软件进行碱基组成和变异分析并构建邻接(Neighbor - joining, NJ)系统发育树。应用 GSDS(http://gsds.cbi.pku.edu.cn)绘制基因结构示意图并手工修改。

2　结果与分析

2.1　黄河裸裂尻鱼 *MSTN* 全长 cDNA 及氨基酸序列分析

黄河裸裂尻鱼 *MSTN* 基因 cDNA 全长为 2 180 bp, 其中开放阅读框(ORF)长 1 128 bp, 编码 375 个

氨基酸; 5'-端非翻译区(5'-UTR)长 76 bp, 3'-端非翻译区(3'-UTR)长 976 bp, 包括典型的多聚腺苷酸加尾信号序列(ATAAA)和 polyA 尾。信号肽预测结果显示, 在其 N 末端含有一个 22 个氨基酸组成的信号肽序列, 切割位点位于 22 位 Gly 和 23 位的 Asp 之间, 起始密码子为ATG, 终止密码子为TGA(图1)。

序列分析显示, 黄河裸裂尻鱼 MSTN 包含两端保守区域: TGF-β 前肽区域(41~257)和 TGF-β 功能区域(278~375)。黄河裸裂尻鱼 MSTN 具有典型的 RXXR 蛋白酶水解位点(263~266)。全序列中有 3 个 N-酰基化位点(N-myristoylation site)、2 个 N-糖基化位点(N-glycosylation site)、6 个酪蛋白激酶Ⅱ磷酸化位点(casein kinase II phosphorylation site)、2 个蛋白激酶C磷酸化位点(protein kinase C phosphorylation site)和 14 个保守的半胱氨酸残基位点(16、40、43、138、139、272、281、282、309、313、339、340、372、374), 其中 5 个位于 TGF-β 前肽区域, 8 个位于 TGF-β 功能区域, 1 个位于信号肽区域(图 1)。

2.2 黄河裸裂尻鱼 *MSTN* 基因内含子序列与分布

将测序得到的序列在 NCBI 网站上 BLAST 确认和比对后, 确定黄河裸裂尻鱼 *MSTN* 基因 2 个内含子序列。内含子 1 长 660 bp, 内含子 2 长 898 bp, 由此获得黄河裸裂尻鱼 *MSTN* 基因全长为 3 738 bp (GenBank NO. JX088635)。黄河裸裂尻鱼 *MSTN* 基因 2 个内含子将 1 128 bp 的编码序列分隔成 3 个外显子: 外显子 1 为 376 bp、外显子 2 为 370 bp、外显子 3 为 382 bp (图 2)。

2.3 MSTN 序列同源性与系统发育分析

应用 DNAMAN Version 6.0 软件, 比较黄河裸裂尻鱼与人、小鼠、猪、牦牛、鸡、草鱼、鳙鱼、鳡、厚颌鲂、稀有鮈鲫、斑马鱼、缨野鲮、鲤、岩原鲤、虹鳟鱼和松江鲈的 MSTN 氨基酸同源性。结果显示, 黄河裸裂尻鱼与以上物种序列同源性分别为 64.7%、63.4%、65.0%、62.9%、64.7%、95.5%、95.8%、95.7%、96.0%、96.0%、92.6%、96.6%、96.3%、96.6%、86.7%和 80.1%。

基于黄河裸裂尻鱼 MSTN 氨基酸序列和 GenBank 公布的其他物种的相应序列构建了脊椎动物系统发育树(图 3)。从图中可以看出, 系统发育树将脊椎动物分成2个主要族群, 其中1个族群由人、哺乳动物和禽类组成; 另一族群由鱼类组成。黄河裸裂尻鱼与其他鲤科鱼类, 如草鱼、鳙鱼、鲤、斑马鱼、稀有鮈鲫、岩原鲤等聚于一支, 这与基于形态学的鱼类系统发育研究结论一致(Wu & Wu, 1991; Saitoh et al, 2006)。

2.4 黄河裸裂尻鱼 *MSTN* 基因的组织特异性表达

采用半定量 RT-PCR 方法, 检测了 *MSTN* 基因 mRNA 在黄河裸裂尻鱼心脏、肝胰脏、肾、肌肉、脑、脂肪、肠、鳃和精巢共 9 个组织中的表达情况(图 4)。结果发现 *MSTN* mRNA 在黄河裸裂尻鱼心、肾、肠、精巢中表达量最高, 肌肉、脑组织中的表达量次之, 脂肪和鳃中有微量表达, 肝胰脏中有极少量表达。

2.5 黄河裸裂尻鱼胚胎不同发育期 *MSTN* 基因的表达

以卵裂期、囊胚期、原肠胚期、神经胚期、器官形成期、尾芽期、肌肉效应器、心跳期、孵化期胚胎 cDNA 为模板, 通过 Real-Time PCR 分析发现, 黄河裸裂尻鱼胚胎在尾芽期 *MSTN* 表达量最高, 其次是器官形成期早期(受精后第 5 天), 而在神经胚期早期(受精后第 3 天)最低。以受精后 4 h *MSTN* 基因表达量为对照, 尾芽期、器官形成期早期(受精后第 5 天)、肌肉效应器和心跳期基因表达量分别是受精后 4 h 的 2.08、1.81 、1.61 和 1.49 倍; 而神经胚期早期(受精后第 3 天)、器官形成期后期(受精后第 7 天)和孵化期表达量分别是受精后 4 h 的 0.33、0.46 和 0.66 倍, 其余各时期表达量变化不明显(图 5)。

3 讨 论

本文克隆获得的黄河裸裂尻鱼 *MSTN* 基因与其他脊椎动物的 *MSTN* 具有较高的同源性, 结构分析显示克隆所得序列拥有 3 个外显子和 2 个内含子, 且外显子和内含子的剪切位点均遵循“GT…AG”法则。黄河裸裂尻鱼 *MSTN* 基因编码 375 个氨基酸, 推导的氨基酸序列中含有 RXXR 蛋白酶水解位点, 在 C 端生物活性区含有 8 个保守的半胱氨酸残基, 并且整条多肽链包含两个典型的 TGF-β 结构域: 即 TGF-β 前肽区域(41~257)和 TGF-β 功能区域(278~375), 符合 TGF-β 超家族蛋白的特征, 与其他脊椎动物的 MSTN 蛋白一致(McPherron et al, 1997; Li et al, 2007; Lu et al, 2010)。基于 MSTN 氨基酸序列的系统发育树将脊椎动物分成 2 个主要族群, 其中由人、哺乳动物和鸡组成一个族群; 所有鱼类组成另一个族群。黄河裸裂尻鱼与其他鱼类, 如草鱼、鳙鱼、鲤、斑马鱼、稀有鮈鲫、岩原鲤等聚于一支,

```
    ATCTACTTGTCCGGTGCGTGGTGAGGTTCATTTCCATAGCAAATCAGATCAAACATCCTTTGGCACGCTTTGGAAC  [76]
ATG CAT TTT ACA CAG GTT TTA ATT TAT CTA AGT GTA TTT ATT GCA TGC GGT TCA GTG AGT  [136]
Met His Phe Thr Gln Val Leu Ile Tyr Leu Ser Val Phe Ile Ala Cys Gly Ser Val Ser  [20]
                         Signal peptide (1-22)          ▲
CAT GGA GAT ATA ACG GCG CAC CAG CAG CCT TCC ACA GCC ACG GAG CAA AGC GAG CAG TGT  [196]
His Gly Asp Ile Thr Ala His Gln Gln Pro Ser Thr Ala Thr Glu Gln Ser Glu Gln Cys  [40]
CK-2 (20-23)                            CK-2 (32-35)                          ▲
TCC ACA TGT GAG TTC AGA CAA CAC AGC AAG CTG ATG AGA CTG CAT GCC ATC AAG TCC CAA  [256]
Ser Thr Cys Glu Phe Arg Gln His Ser Lys Leu Met Arg Leu His Ala Ile Lys Ser Gln  [60]
CK-2 (41-44) ▲
ATT CTC AGC AAA CTC CGA CTC AAA CAG GCT CCA AAT ATT AGC CGG GAC GTG GTC AAG CAG  [316]
Ile Leu Ser Lys Leu Arg Leu Lys Gln Ala Pro Asn Ile Ser Arg Asp Val Val Lys Gln  [80]
                                            N-glycosylation (72-75)
CTG TTA CCC AAA GCA CCG CCT TTG CAA CAA CTT CTG GAT CAG TAC GAT GTT CTG GGG GAT  [376]
Leu Leu Pro Lys Ala Pro Pro Leu Gln Gln Leu Leu Asp Gln Tyr Asp Val Leu Gly Asp  [100]

GGC AGT AAG GAT GGA GCT ATG GAA GAG GAT GAT GAA CAT GCC ACC ACC GAG ACC ATC ATG  [436]
Gly Ser Lys Asp Gly Ala Met Glu Glu Asp Asp Glu His Ala Thr Thr Glu Thr Ile Met  [120]
 N-myristoylation (101-106)
ACC ATG GCC ACA GAG CCT GAC CCA ATC GTT CAA GTA GAT CGG AAA CCG AAG TGT TGT TTT  [496]
Thr Met Ala Thr Glu Pro Asp Pro Ile Val Gln Val Asp Arg Lys Pro Lys Cys Cys Phe  [140]
            CK-2 (124-127)                                          ▲   ▲
TTC TCC TTC AGT CCG AAG ATT CAA GCG AAC CGG ATC GTA AAA GCG CAG CTG TGG GTT CAT  [556]
Phe Ser Phe Ser Pro Lys Ile Gln Ala Asn Arg Ile Val Lys Ala Gln Leu Trp Val His  [160]
            PKC (144-146)
CTG AGA CCG GCG GAA GGA GCG ACC ACC GTC TTC TTA CAG ATA TCA CGC CTG ATG CCT CTT  [616]
Leu Arg Pro Ala Glu Gly Ala Thr Thr Val Phe Leu Gln Ile Ser Arg Leu Met Pro Leu  [180]

ACG GAC GGA GGA AGG CAC ATA CGA ATA CGA TCC CTG AAG ATC GAT GTG AAC GCA GGA GTG  [676]
Thr Asp Gly Gly Arg His Ile Arg Ile Arg Ser Leu Lys Ile Asp Val Asn Ala Gly Val  [200]
                                        PKC (191-193)
ACA TCT TGG CAG AGT ATA GAC GTA AAA CAG GTG CTC GCG GTG TGG TTA AGA CAG CCG GAG  [736]
Thr Ser Trp Gln Ser Ile Asp Val Lys Gln Val Leu Ala Val Trp Leu Arg Gln Pro Glu  [220]

ACC AAC TGG GGC ATT GAG ATA AAC GCG TAT GAC GCG AAG GGA AAC GAC TTG GCC GTC ACC  [796]
Thr Asn Trp Gly Ile Glu Ile Asn Ala Tyr Asp Ala Lys Gly Asn Asp Leu Ala Val Thr  [240]
            N-myristoylation (224-229)             N-myristoylation (234-239)
TCA GCC GAG CCT GGA GAA GAT GGA CTG CTC CCC TTC ATG GAG GTG AAA ATC TCG GAG GGT  [856]
Ser Ala Glu Pro Gly Glu Asp Gly Leu Leu Pro Phe Met Glu Val Lys Ile Ser Glu Gly  [260]
CK-2 (240-243)
CCA AAG CGA ATC CGG AGG GAC TCC GGG CTG GAC TGC GAC GAG AAT TCG TCA GAG TCT CGA  [916]
Pro Lys Arg Ile Arg Arg Asp Ser Gly Leu Asp Cys Asp Glu Asn Ser Ser Glu Ser Arg  [280]
          RXXR           CK-2 (268-271)   ▲       N-glycosylation (72-75)
TGC TGC AGG TAC CCG CTC ACT GTG GAC TTC GAG GAC TTC GGC TGG GAC TGG ATT ATT GCT  [976]
Cys Cys Arg Tyr Pro Leu Thr Val Asp Phe Glu Asp Phe Gly Trp Asp Trp Ile Ile Ala  [300]
 ▲   ▲
CCA AAA CGC TAT AAG GCG AAT TAT TGT TCT GGA GAA TGC GAT TAC ATG CAC CTG CAG AAA  [1036]
Pro Lys Arg Tyr Lys Ala Asn Tyr Cys Ser Gly Glu Cys Asp Tyr Met His Leu Gln Lys  [320]
                                 ▲           ▲
TAT CCC CAC ACC CAT CTG GTG AAC AAG GCC AAC CCG CGA GGC ACC GCC GGG CCC TGC TGC  [1096]
Tyr Pro His Thr His Leu Val Asn Lys Ala Asn Pro Arg Gly Thr Ala Gly Pro Cys Cys  [340]
                                                                        ▲   ▲
ACC CCC ACC AAG ATG TCT CCC ATC AAC ATG CTT TAC TTC AAC GGC AAA GAG CAG ATC ATC  [1156]
Thr Pro Thr Lys Met Ser Pro Ile Asn Met Leu Tyr Phe Asn Gly Lys Glu Gln Ile Ile  [360]

TAC GGC AAG ATC CCC TCA ATG GTA GTA GAC CGC TGT GGC TGC TCG TGA                  [1204]
Tyr Gly Lys Ile Pro Ser Met Val Val Asp Arg Cys Gly Cys Ser  *                   [375]
                                            ▲       ▲
ACCAGTGCCCAGACAGGACTCGATTCGTCTCACAGGCCCGGACATCTGATCACACCACCCACCCTCCATTATCAGTGCTT  [1284]
TCCGCAAGACACTGTGCAATAGATGGACGCTCACTCACTCTCTGGGCACCGCTTCATATGACTATGTTTTTTGTCATTTT  [1364]
CCTCTAAATCGGCATCTCTGCCACAGGAGTCCAATGTTACATGGATGTACTAAAGGAATGTTATATACAGGCTGGACTTG  [1444]
GGAATGGACACTTTTGAAATGGACGACATTCTCTGCTTTATTTCATGTTTTCACCTTGTCAGAATTCTCTCATTAGGATA  [1524]
CGCAGACAACATTGTATTACGCAACCACTCCAAAATACAATCATTTAGATTTGCTGTAACAGCTGAGCTTGTTTAAGAAG  [1604]
GGTATCCAAGAGAAACAGAGAGGGACTCTTGAACATTGAACAGAGCTTGAATACAGTTATTTGACGCAAACTTCCACACA  [1684]
CACTACAATAAACACACAGATCGAATTGTTAATTGTAGCTTTTGTCCACTACGCATTTGTCAAACAGCCCTACACACTTG  [1764]
AAGTATTATTGAAATCGGCATTAGGGGACAGAAGGACTTGAAGCAAAGGTGCTGTGAATGCGGTCTATACATTGAAATGT  [1844]
GTTCGAGACAGAGACATCAGAACTGTAAGAATGAATGTTAATATCACGCTAACACTCTGTTTTCAAACCACACAGTTTGC  [1924]
ACTATGGCAGACCAATAGAAAAAATTGGTTGCTAAAAATGTTGTAAAAACAGATTTTGATATGTTTGCTAATTGTATTGT  [2004]
ATACTTGCCATTGTTTCCATTAACAGTTGCCTTTTTTTAACCACGGTTAGTACATGTATAGGAACACGAAATAGCAAAAA  [2084]
AGTGTACAATATAAATTTATGTATCTGTTCAAACAAATAAAGGTGCTTGCTTTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA  [2164]
AAAAAAAAAAAAAAAA                                                                  [2180]
```

图 1　黄河裸裂尻鱼 *MSTN* 基因 cDNA 序列及其推导的氨基酸序列

Fig. 1　*MSTN* cDNA and deduced amino acid sequence of *Schizopygopsis pylzovi*

灰色阴影表示信号肽序列(1-22), 下划线表示蛋白水解酶位点(RXXR), ▲ 表示保守的半胱氨酸残基, *表示终止密码子。图中缩写代表各功能域, 即 CK-2：酪蛋白激酶Ⅱ磷酸化作用位点; N-glycosylation：N-糖基化位点; N-myristoylation：N-酰基化位点; PKC：, 蛋白激酶 C 磷酸化作用位点。

The signal peptide sequence is marked with shadow box (1-22). The conservatively hydrolytic site (RXXR) is underlined. Black triangles indicate the conservative cysteine residues. Asterisk indicates stop codon. The abbreviation of motifs is presented as follows: CK-2, casein kinase II phosphorylation site; N-glycosylation, N-glycosylation site; N-myristoylation, N-myristoylation site; PKC, protein kinase C phosphorylation site.

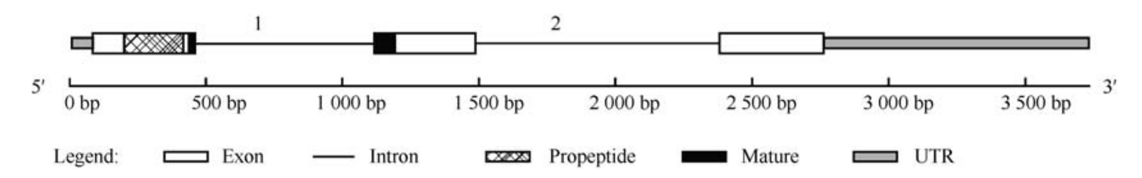


图 2 黄河裸裂尻鱼 *MSTN* 基因结构示意图

Fig. 2 *MSTN* gene structure of *Schizopygopsis pylzovi*

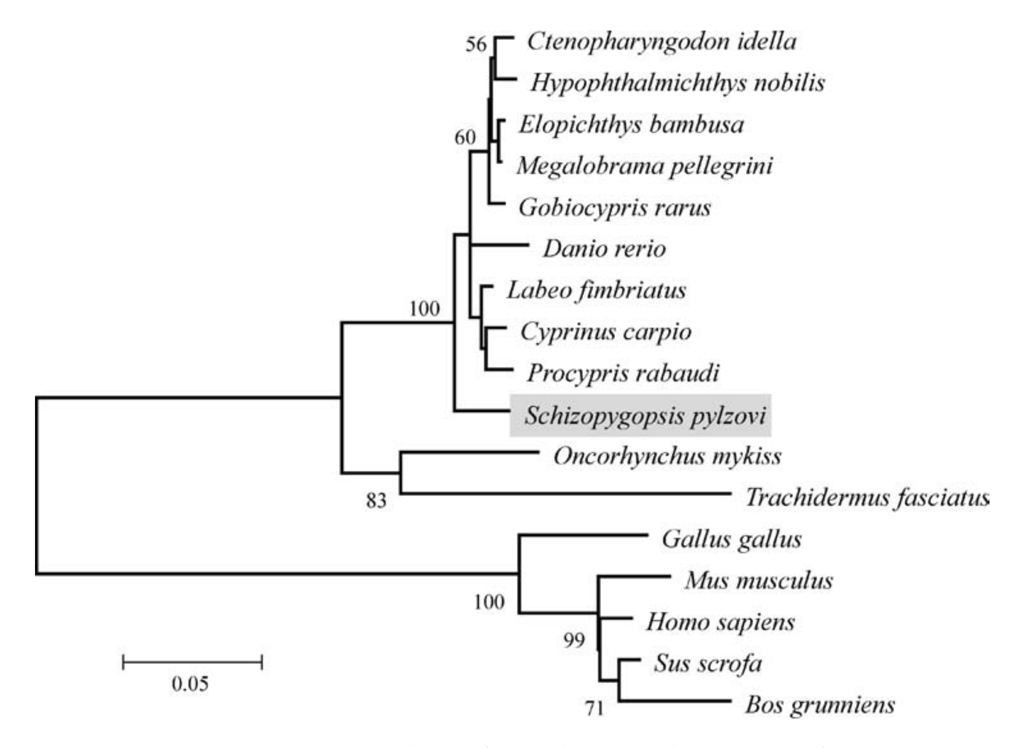


图 3 基于 *MSTN* 基因氨基酸序列构建的部分脊椎动物系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree of representative vertebrates based on MSTN amino acid sequences

节点上数据表示 1 000 次重复的支持率(%, 仅显示≥50%的值)。各物种 MSTN 序列登录号分别为：人(ABI48422)、小鼠(NM_010834)、猪(ABR08657)、牦牛(ABY74330)、鸡(ACY68210)、草鱼(ACB45875)、鳙鱼(AEJ83922)、鳡(ADK94456)、厚颌鲂(ADD71156)、稀有鮈鲫(ACK76230)、斑马鱼(AAP85526)、缨野鲮(AEN75197)、鲤(ACS92640)、岩原鲤(ADD71155)、虹鳟鱼(NP_001117754)和松江鲈(GU198192)。

Numbers at the nodes denote the bootstrap values of 1,000 replicates (only those ≥50% are shown). GenBank accession numbers of MSTN sequences used are: *Homo sapiens*, ABI48422; *Mus musculus*, NM_010834; *Sus scrofa*, ABR08657; *Bos grunniens*, ABY74330; *Gallus gallus*, ACY68210; *Ctenopharyngodon idella*, ACB45875; *Hypophthalmichthys nobilis*, AEJ83922; *Elopichthys bambusa*, ADK94456; *Megalobrama pellegrini*, ADD71156; *Gobiocypris rarus*, ACK76230; *Danio rerio*, AAP85526; *Labeo fimbriatus*, AEN75197; *Cyprinus carpio*, ACS92640; *Procypris rabaudi*, ADD71155; *Oncorhynchus mykiss*, NP_001117754; *Trachidermus fasciatus*, GU198192.

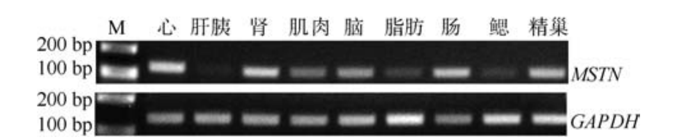


图 4 黄河裸裂尻鱼 *MSTN* 基因的半定量 RT-PCR 检测结果

Fig. 4 Detection of *MSTN* expression in *Schizopygopsis pylzovi* by semiquantitative reverse transcription PCR

M：100 bp 分子量标记(100 bp molecular marker)。.

这与基于形态学的鱼类系统发育研究结论一致(Wu & Wu, 1991; Saitoh et al, 2006)。

研究表明，哺乳动物与鱼类 *MSTN* 基因的组织表达不尽相同。在成体小鼠中, *MSTN* 基因强烈表达于骨骼肌中，而在肺、胸腺、脑、肾、胰腺、肠、脾、睾丸、肝、卵巢等组织中不表达或只有极少量表达(McPherron et al, 1997)；在猪中除骨骼肌外，乳腺中也有表达，提示 *MSTN* 基因与母猪妊娠或泌乳期乳腺的生长发育有关(Ji et al, 1998)；在羊和牛中除骨骼肌外，心脏组织中有 *MSTN* 基因的表达，且定位于心脏的浦肯野氏纤维和心肌细胞中，说明在羊和牛心肌发育过程，MSTN 也起到重要作用(Sharma et al,1999)。鱼类 MSTN 在机体中的分布比哺乳动物广泛，除了在骨骼肌表达以外，还可以在

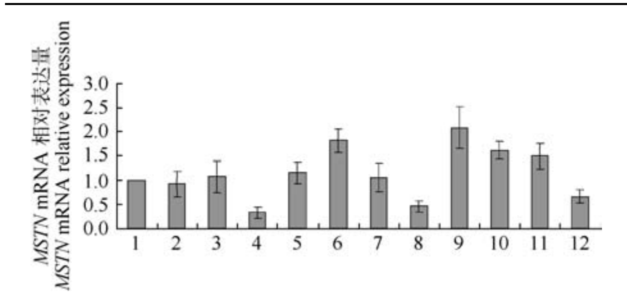


图 5　黄河裸裂尻鱼胚胎不同发育期 *MSTN* mRNA 的相对表达量

Fig. 5　Real-time PCR analysis of *MSTN* transcripts of embryos in different development stages

X 坐标中数字分别表示：1: 卵裂期(受精后约 4 h); 2: 囊胚期(受精后第 1 天); 3: 原肠胚期(受精后第 2 天); 4~5: 神经胚期(受精后第 3~4 天); 6~8: 器官形成期(受精后第 5~7 天); 9: 尾芽期(受精后第 8 天); 10: 肌肉效应器(受精后第 9 天); 11:心跳期(受精后第 10 天); 12: 孵化期(受精后第 11 天)。

The numbers of X-axis are presented as follows: 1, cleavage stage (about 4 hours after fertilization); 2, blastula stage(day 1 after fertilization); 3, gastrula stage (day 2 after fertilization); 4-5, neurula stage (from days 3-4 after fertilization); 6-8, organogenetic stage (from days 5-7 after fertilization); 9. tail-bud stage (day 8 after fertilization); 10, muscular contraction stage (day 9 after fertilization); 11, heartbeat stage (the day 10 after fertilization); 12, hatching stage (from day 11-12 after fertilization).

多个组织中表达，如脑、肠、鳃、肾、眼睛、脾、心、肝、性腺等。Amali et al(2003)发现斑马鱼 *MSTN* 基因的表达不仅仅限于骨骼肌，在所有检测的组织，如肝、心、胃、鳃、卵巢、精巢、肾、肌肉、眼和脑中均有表达，在大西洋鲑鱼的研究中也获得与斑马鱼基本相同的结果(Rescan et al, 2001)。普通鲤鱼 *MSTN* 基因主要在肌肉和脑部表达，其他组织无表达(Li et al, 2007)，而鳡的 *MSTN* 基因在组织中的表达较为广泛(Yu et al, 2010)。由此可见，即便是在硬骨鱼类中，*MSTN* 基因的表达也有所差异。本研究发现，*MSTN* 基因在黄河裸裂尻鱼心、肾、肠、精巢、肌肉、脑、脂肪、鳃、肝胰脏组织中均有表达，从表达特征和表达水平来看与其他硬骨鱼类一定差异，这可能暗示黄河裸裂尻 *MSTN* 基因除对肌肉生长发育起到调控作用以外，可能还有其他功能，如参与代谢功能、性腺和心肌发育调控。

MSTN 基因在小鼠胚胎发育到 9.5 d 的 1/3 体节中开始表达，只限于最成熟的吻端部分，在小鼠发育到 10.5 d 时，在所有生肌节中均可检测到 *MSTN* 基因的表达；斑马鱼 *MSTN* 基因的表达是母源性的，从 1 细胞就开始表达(Amali et al, 2003)；Vianello et al(2003)也发现斑马鱼的 *MSTN* 转录子在 1 细胞中就出现，受精后 8 h 降低，在受精后 16 h，*MSTN* mRNA 水平再次增加，显示由胚胎转录而来，预示肌肉细胞分化的开始，受精后 24 h，当体节发生几乎完成的时候，*MSTN* mRNA 轻微降低；斑点叉尾鮰 *MSTN* 基因在受精后第一天的胚胎中就开始表达(Kocabas et al, 2002)，而在牙鲆和虹鳟胚胎发育过程中并没有检测到 *MSTN* 基因的表达(Xu & Chen, 2008)。虽然本研究未检测黄河裸裂尻鱼 *MSTN* 在 1 细胞期的表达情况，但是在卵裂期已经开始表达，并且在孵化至第 3 天时 *MSTN* mRNA 水平明显下降，可能预示肌肉细胞分化的开始；在器官形成期早期(受精后第 5 天)、尾芽期、肌肉效应器和心跳期 *MSTN* mRNA 水平再次增加，表现出与斑马鱼和其他鱼类胚胎不同的 *MSTN* 基因表达特征。黄河裸裂尻鱼 *MSTN* 基因在胚胎不同发育阶段的独特表达特征暗示，MSTN 的功能可能并不局限在对肌肉生长发育的负调控作用，但是否在胚胎发育中发挥其他功能还有待进一步研究和证实。

参考文献：

Acosta J, Carpio Y, Borreto I, González O, Estrada MP. 2005. Myostatin gene silenced by RNAi show a zebrafish giant phenotype [J]. *J Biotechnol*, **119**(4): 324-331.

Amali AA, Lin CJF, Chen YH, Wang WL, Gong HY, Lee CY, Ko YL, Lu JK, Her GM, Chen TT, Wu JL. 2003. Up-regulation of muscle-specific transcription factors during embryonic somitogenesis of zebrafish (*Danio rerio*) by knock-down of myostatin [J]. *Dev Dyn*, **229**(4): 847-856.

Burland TG. 2000. DNASTAR's Lasergene sequence analysis software [J]. *Methods Mol Biol*, **132**: 71–91.

Ji S, Losinski RL, Cornelius SG, Frank GR, Willis GM, Gerrard DE, Depreux FFS, Spurlock ME. 1998. Myostatin expression in porcine tissues: tissue specificity and developmental and postnatal [J]. *Am J Physiol*, **275**(4 Pt 2): R1265-R1273.

Kocabas AM, Kucuktas H, Dunham RA, Liu ZJ. 2002. Molecular characterization and differential expression of the myostatin gene in channel catfish (*Ictalurus punctatus*) [J]. *Biochim Biophys Acta*, **1575**(1-3): 99-107.

Kumar S, Tamura K, Nei M. 2004. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment [J]. *Brief Bioinform*, **5**(2): 150-163.

Li XM, Fan W, Zhang B, Peng K, Wang YF, Hu W, Zhao HB. 2007. Cloning of myostatin of common carp and its expression pattern in different tissues [J]. *Acta Hydrobiol Sin*, 2007, **31**(5): 643-648. [李兴美, 范巍, 张彬, 彭扣, 王玉凤, 胡炜, 赵浩斌. 2007. 鲤鱼肌肉生长抑制素基因(MSTN)的克隆及其组织表达特征. 水生生物学报, 2007, **31**(5): 643-648.]

Lu XY, Zhang Y, Wang XG, Zhang YP, Xu JR, Lai R, Gu ZL. 2010.

Identification and characterization of myostatin gene in rough-skinned sculp, trachidermus fasciatus [J]. *Zool Res*, **31**(4): 387-394. [卢祥云, 张营, 王星果, 张燕萍, 徐建荣, 赖伋, 顾志良. 2010. 松江鲈肌肉生长抑制素基因克隆和序列特征分析. 动物学研究, **31**(4): 387-394.]

McPherron AC, Lawler AM, Lee SJ. 1997. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-β superfamily member [J]. *Nature*, **387**(6628): 83-90.

Patel K, Amthor H. 2005. The function of myostatin and strategies of myostatin blockade-new hope for therapies aimed at promoting growth of skeletal muscle [J]. *Neuromuscul Disord*, **15**(2): 117-126.

Qi DL, Guo SC, Zhao XQ, Yang J, Tang WJ. 2007. Genetic diversity and historical population structure of *Schizopygopsis pylzovi* (Teleostei: Cyprinidae) in the Qinghai-Tibetan Plateau [J]. *Freshw Biol*, **52**(6): 1090-1104.

Qi DL, Chao Y, Guo SC, Zhao XQ. 2008. Genetic structure of five Huanghe schizothoracin Schizopygopsis pylzovi populations based on mtDNA control region sequences [J]. *Acta Zool Sin*, **54**(6): 972-980. [祁得林, 晁燕, 郭松长, 赵新全. 2008. 黄河裸裂尻鱼五种群mtDNA控制区的遗传结构. 动物学报, **54**(6): 972-980.]

Qi DL, Li TP, Chao Y, Yang C. 2009. Taxonomic status of *Schizopygopsis kessleri* inferred from Cyt *b* gene sequence [J]. *Chn J Zool*, **44**(4): 1-7. [祁得林, 李太平, 晁燕, 杨成. 2009. 利用Cyt *b*基因序列探讨柴达木裸裂尻鱼的分类学地位. 动物学杂志, **44**(4): 1-7.]

Qi DL, Chao Y, Guo SC, Zhao LY, Li TP, Wei FL, Zhao XQ. 2012. Convergent, Parallel and Correlated Evolution of Trophic Morphologies in the Subfamily Schizothoracinae from the Qinghai-Tibetan Plateau [J]. *PLoS ONE*, **7**(3): e34070.

Reisz-Porszasz S, Bhasin S, Artaza JN, Shen RQ, Sinha-Hikim I, Hogue A, Fielder TJ, Gonzalez-Cadavid NF. 2003. Lower skeletal muscle mass in male transgenic mice with muscle-specific overexpression of myostatin [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **285**(4): 876-888.

Rescan PY, Jutel I, Rallière C. 2001. Two myostatin genes are differentially expressed in myotomal muscles of the t rout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. *J Exp Biol*, **204**(Pt 20): 3523-3529.

Rios R, Cameiro I, Arce VM, Devesa J. 2002. Myostatin is an inhibitor of myogenic differentiation [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, **282**(5): C993-C999.

Saitoh K, Sado T, Mayden RL, Hanzawa N, Nakamura K, Nishida M, Miya M. 2006. Mitogenomic evolution and interrelationships of the Cypriniformes (Actinopterygii: Ostariophysi): the first evidence toward resolution of higher-level relationships of the world's largest freshwater fish clade based on 59 whole mitogenome sequences [J]. *J Mol Evol*, **63**(6): 826-841.

Sharma M, Kambadur R, Matthews KG, Somers WG, Devlin GP, Conaglen JV, Fowke PJ, Bass JJ . 1999. Myostatin, a transforming growth factor-beta superfamily member, is expressed in heart muscle and is upregulated in cardiomyocytes after infarct [J]. *J Cell Physiol*, **180**(1): 1-9.

Vianello S, Brazzoduro L, Valle LD, Belvedere P, Colombo L. 2003. Myostatin expression during development and chronic stress in zebrafish (*Danio rerio*) [J]. *J Endocrinol*, **176**(1): 47-59.

Wu YF. 1984. Systematics and taxonomy of the the Schizothoracine fishes in China [J]. *Acta Biol Plat Sin*, (3): 119-139. [武云飞. 1984. 中国裂腹鱼亚科鱼类分类与系统关系研究. 高原生物学集刊, (3): 119-139.]

Wu YF, Wu CZ. 1991. The Fishes of the Qinghai-Xizang Plateau [M]. Chengdu: Sichuan Publishing House of Science & Technology. [武云飞, 吴翠珍. 1991. 青藏高原鱼类. 成都: 四川科学技术出版社.]

Xu JY, Chen SL. 2008. Cloning and expression analysis of the myostatin (MSTN) gene in *Paralicht hys olivaceus* [J]. *J Fisher Chn*, **32**(4): 497-506. [徐建勇, 陈松林. 2008. 牙鲆肌肉生长抑制素(MSTN)基因克隆. 水产学报, **32**(4): 497-506.]

Yu JF, Zhang Y, Wang XG, Xu JR, Lu XY, Li JL, Gu ZL. 2010. Cloning and expression analysis of the myostatin gene in Elopichthys bambusa [J]. *J Fisher Chn*. **34**(10): 1486-1493. [郁建锋, 张营, 王星果, 徐建荣, 卢祥云, 李建林, 顾志良. 2010. 鳡肌肉生长抑制素(MSTN)基因的克隆及其组织特异性表达分析. 水产学报, **34**(10): 1486-1493.]

动 物 学 研 究 2012，Oct. 33(5): 481−486 CN 53-1040/Q ISSN 0254-5853
Zoological Research DOI：10.3724/SP.J.1141.2012.05481

花鲈 Wap65-2 基因的克隆、理化性质及其表达与哈维氏弧菌感染的相关性

史雨红，陈 炯[*]，高姗姗，沈广强，陆新江，李明云

(宁波大学 应用海洋生物技术教育部重点实验室，浙江 宁波 315211)

摘要：Wap65-2 (warm temperature acclimation related 65 kDa protein-2)是鱼类中发现的一种血浆糖蛋白，与细菌感染性免疫应激紧密相关。该研究首次克隆了花鲈 Wap65-2 基因全长 cDNA 序列。它由 1 601 个核苷酸组成，包含一个大的开放阅读框，预期编码一个由 436 个氨基酸组成、相对分子质量为 4.87×10^4 的前体蛋白，N 端 19 个残基为信号肽序列。序列和系统进化树分析表明，花鲈 Wap65-2 与欧洲海鲈进化关系最近，两者氨基酸同源性高达 80.7%。健康花鲈 Wap65-2 基因 mRNA 主要在肝中表达，心和肌肉中少量表达。qRT-PCR 分析揭示，哈维氏弧菌(*Vibrio harveyi*)感染感染 12 h 后，花鲈肝中 Wap65-2 基因 mRNA 表达显著上调，24 h 时达到峰值，为健康对照的 6.89 倍。原核表达花鲈 Wap65-2 并制备抗血清。Western blot 分析表明，哈维氏弧菌感染 12 h 后，花鲈血清中 Wap65-2 含量显著增加，36 h 时达到最大值，为健康对照的 5.33 倍。综上所述，花鲈 Wap65-2 基因的表达与其细菌感染性免疫应激紧密相关。

关键词：Wap65-2 基因；花鲈；哈维氏弧菌；实时荧光定量 PCR；Western blot
中图分类号：Q959.483; Q344.13 **文献标志码**：A **文章编号**：0254-5853-(2012)05-0481-06

Cloning, physical and chemical property analysis of the Japanese sea bass Wap65-2 gene and its expression following *Vibrio harveyi* infection

SHI Yu-Hong, CHEN Jiong[*], GAO Shan-Shan, SHEN Guang-Qiang, LU Xin-Jiang, LI Ming-Yun

(*Key Laboratory of Applied Marine Biotechnology*, *Ministry of Education*, *Ningbo University*, *Ningbo* 315211, *China*)

Abstract: The warm temperature acclimation related 65 kDa protein-2 (Wap65-2), a teleost plasma glycoprotein, plays an important role in immune regulation against bacterial infection. Here, for the first time we determined the full length cDNA sequence of the Japanese sea bass Wap65-2 gene (1601 bp in length excluding the 3'-polyA tail). The sequence contains an open reading frame that encodes a protein of 436 amino acids with a molecular weight of 4.87×10^4. The predicted protein had a signal peptide in the N-terminal domain containing 19 residues. Sequence comparison and phylogenetic tree analysis showed that the Japanese sea bass Wap65-2 has a relatively high similarity to the *Dicentrarchus labrax* Wap65-2. In the healthy Japanese sea bass, Wap65-2 mRNA was expressed mainly in the liver and weakly in the heart and muscle. qRT-PCR results revealed that liver Wap65-2 transcripts were significantly increased after a *Vibrio harveyi* infection, and peaked 24 hour post injection (6.89 fold increase). The Japanese sea bass Wap65-2 protein was expressed in *Escherichia coli* and subsequently used for antiserum preparation. Western blot analysis showed that Wap65-2 was significantly increased in *V. harveyi* infected Japanese sea bass and reached a maximum of 5.33-fold increase at 36 h. In conclusion, the alteration of Japanese sea bass Wap65-2 expression was tightly associated with the progression of the *V. harveyi* bacterial infection.

Key words: Wap65-2; *Lateolabrax japonicus*; *Vibrio Harveyi*; qRT-PCR; Western blot

Wap65s (warm temperature acclimation related 65 kDa protein)是鱼类中发现的一类血浆糖蛋白，

收稿日期：2012-04-19；接受日期：2012-08-21
基金项目：教育部新世纪优秀人才支持计划项目(NCET-08-0928)；浙江省自然科学基金(Y3110053)；宁波市自然科学基金(2010A610006)；中央财政支持地方高校发展专项（xkc11005）
[*]通信作者(Corresponding author)，Tel: 0574-87609571, E-mail: jchen1975@163.com
第一作者简介：史雨红(1979−)，女，浙江富阳人，讲师，研究方向为水产分子免疫学；Tel: 13484273300; E-mail: shiyuhong0517@163.com

因其与暖温适应相关且相对分子质量为 6.5×10^4 而得名。该类蛋白存在 Wap65-1 和 Wap65-2 两种异构体(Hirayama et al, 2003)。研究表明, Wap65-2 具有多种生物学功能, 它与鱼类暖温适应(Hirayama et al, 2003)、重金属胁迫(Aliza et al, 2008)和生长发育(Hirayama et al, 2004)等紧密相关。近年来, Wap65-2 在细菌感染性免疫应激中的作用日益引起人们的关注(Cho et al, 2012; Li et al, 2011; Peatman et al, 2008; Sha et al, 2008; Shi et al, 2010)。目前, 多种鱼类 Wap65-2 基因序列已被克隆, 包括东方红鳍鲀(*Takifugu rubripes*) (Hirayama et al, 2003)、青鳉(*Oryzias latipes*) (Hirayama et al, 2004)、蓝鲇(*Ictalurus furcatus*) (Peatman et al, 2008)、斑点叉尾鮰(*I. punctatus*) (Sha et al, 2008)、剑尾鱼(*Xiphophorus hellerii*) (Aliza et al, 2008)、真裸南极鱼(*Harpagifer antarcticus*) (Clak & Burns, 2008)、香鱼(*Plecoglossus altivelis*) (Shi et al, 2010)、欧洲海鲈(*Dicentrarchus labrax*) (Sarropoulou et al, 2010)和大鳞泥鳅(*Misgurnus mizolepis*) (Cho et al, 2012)。

花鲈(*Lateolabrax japonicus*, Japanese sea bass)俗称鲈鱼、七星鲈, 属鲈形目鮨科花鲈属, 是东北亚特有种、分类学代表种, 具有广温性和广盐性特点, 是我国重要的海水养殖对象之一。随着海水网箱养殖规模的不断扩大、集约化程度的不断提高、养殖环境污染等诸多因素的影响, 花鲈网箱养殖的细菌性病害发生频繁且给产业造成了巨大的危害(Wang et al, 2002)。抗生素为代表的传统治疗方法易产生抗药性和药残等原因, 已逐渐被禁用和取代。免疫学是研究生物体对抗原物质免疫应答性及其方法的学科, 是有效防治各类病害的基础, 也是水产动物的研究热点之一。本文拟通过克隆花鲈 Wap65-2 基因 cDNA 全序列, 明确了其序列特征、系统进化关系及 mRNA 的组织表达特征, 随后原核表达制备了抗血清, 并分别采用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 和 Western blot 技术研究了花鲈肝组织 Wap65-2 基因 mRNA 和血清 Wap65-2 蛋白的表达与哈维氏弧菌(*Vibrio harveyi*)感染的相关性, 为进一步深入研究 Wap65-2 在鱼类细菌性免疫中的分子作用机制奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料与试剂

健康花鲈体重约 70~80 g, 体长约 15~22 cm, 购自宁波象山港养殖场。大肠杆菌 TG1、BL21 plysE 菌株和原核表达载体 pET-28a 由本实验室保存。RNAiso 试剂、SMART RACE cDNA amplification kit、*Ex Taq* DNA 聚合酶、DNA Ligation Kit Ver.2.0、SYBR *Premix Ex Taq* 试剂盒均购自 Takara 公司; Gel Extraction Kit 购自 Omega 公司; 引物由上海英俊生物技术有限公司合成; 肽 N-糖苷酶 F (PNGase F)购自 New England Biolabs 公司; 二抗 (辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠 IgG) 购自北京中山金桥生物技术有限公司; ECL 化学发光试剂盒、显影定影试剂盒购自碧云天生物技术研究所; ICR 小鼠购自宁波大学医学院实验动物中心。哈维氏弧菌 Mm001 分离株来自鮸鱼 (Shi et al, 2012); 其他常规化学药剂均为国产分析纯。

1.2 样品制备

健康花鲈分为感染组和对照组, 共 35 尾, 实验组每尾花鲈腹腔注射 100 μL (3.8×10^6 CFU)哈维氏弧菌 PBS 悬液, 对照组每尾花鲈注射同体积无菌 PBS。注射后 12 h, 随机挑选感染组花鲈 3 尾进行病原菌分离, 确认接种效果(Li et al, 2009)。感染组和对照组花鲈分别于注射后 12、24、36 和 48 h 取样, 每次 4 尾/组, 其中尾静脉抽取的血液于 4 ℃静置 4 h 析出血清, 离心后血清保存于−70 ℃。

1.3 花鲈 Wap65-2 cDNA 序列的获得

提取健康花鲈肝组织总 RNA, 总 RNA 经电泳检测和紫外分光光度计纯度分析。用 SMART RACE cDNA amplification kit 合成肝 cDNA, 具体方法参照厂家说明书。根据数据库中已知的东方红鳍鲀、青鳉、蓝鲇、斑点叉尾鮰、剑尾鱼、真裸南极鱼、香鱼以及欧洲海鲈 Wap65-2 保守结构域设计兼并引物 Wap65-2-3t (+): 5'-CGCTGGCTVGAGCACTAYTACTG-3', V = A, G, or C, Y=T, C, 与试剂盒自带引物 Nested Universal Primer A(5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3')配对以肝 cDNA 为模板进行聚合酶链式反应(PCR)获得 3'-端部分序列; 随后根据 3'-端部分序列设计特异引物 Wap65-2-5t (-): 5'-TAATTGCGGGCATCCTTTGG-3', 与 Nested Universal Primer A 配对扩增获得 5'-端部分序列。测序由上海华大基因科技有限公司完成, 序列拼接获得花鲈 Wap65-2 基因全长 cDNA 序列。信号肽序列预测采用 SignalP 4.0 程序 (http://www.cbs.dtu.dk/ services/SignalP/)。系统进化树构建采用 MEGA 5.0 软件(Tamura et al, 2011), N-糖基化位点预测采用 NetNGlyc

程序(http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/)。

1.4 花鲈 Wap65-2 基因 mRNA 的组织表达特征分析

根据已获得的花鲈 Wap65-2 基因 cDNA 序列设计特异引物 jWap65-2 (+)：5'-CCCCATCGAGCACGGTATTGT-3'和 jWap65-2 (-)：5'-CATGGCGGGGGTGTTGAAGGT-3', 预期扩增片段长度为 129 bp。根据花鲈看家基因β-actin cDNA 序列 (HE577671) 设计引物 jActin (+)：5'-CCCCATCGAGCACGGTATTGT-3' 和 jActin (-)：5'-CATGGCGGGGGTGTTGAAGGT -3', 预期扩增片段长度为 190 bp。采用 RNAiso 试剂提取 3 尾健康花鲈各组织总 RNA, DNase I 处理、第一链 cDNA 合成和 PCR 扩增等方法同文献 (Huang et al, 2011)。

1.5 哈维氏弧菌感染的花鲈肝 Wap65-2 基因 mRNA 表达定量分析

抽提哈维氏弧菌感染不同时段的花鲈肝总 RNA, DNase I 处理后合成第一链 cDNA, 以其为模板, 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR)检测 Wap65-2 基因和β-actin 基因 mRNA 的表达变化, 引物对分别为 jWap65-2 (+)/jWap65-2(-)和 jActin(+)/jActin(-)。每组 4 个样品, 每个样品技术重复 3 次。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 分析 Wap65-2 基因 mRNA 的相对表达量 (Livak & Schmittgen, 2001)。

1.6 花鲈 Wap65-2 基因的原核表达和抗血清制备

设计花鲈 Wap65-2 基因原核表达扩增引物 pjWap65-2(+):5'-GGAATTCCATATGGCACCTGCGGCGCCACAAGA-3'和 pjWap65-2(-): 5'-GGAATTCTTAATCCTGACATCCCATCAT-3', 下划线为 *Nde* I 和 *Eco*R I 酶切位点序列, 其预期编码蛋白为 Wap65-2 去除信号肽的成熟蛋白部分。以 cDNA 为模板 PCR 扩增获得目的片段, 扩增产物经 1% (w/v) 琼脂糖凝胶电泳分离后, 用 QIAquick Gel Extraction 纯化。重组表达质粒 pET-28a-jWap65-2 构建、IPTG 诱导表达和抗血清制备等方法同文献 (Huang et al, 2011)。

1.7 蛋白质 Western blot 分析

花鲈血清蛋白样品处理、SDS 分离、转膜和 ECL 化学发光检测等方法同文献 (Huang et al, 2011)。一抗为所制备的小鼠抗花鲈 Wap65-2 抗血清, 二抗为辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠 IgG。

1.8 蛋白糖基化检测

根据糖苷酶试剂盒说明, 取血清蛋白 9 μL (约 20 μg), 变性后用 PNGase F 酶切处理, 蛋白质印迹检测 Wap65-2 (Kong et al, 2012)。

1.9 数据分析

qRT-PCR 和 Western blot 分析实验结果表示为平均值±标准误差, 采用单因素方差分析(One-way ANOVA)进行统计分析(SPSS 软件), 其中 $P<0.05$ 为显著差异。

2 结 果

2.1 花鲈 Wap65-2 基因 cDNA 序列分析

采用 RACE 技术分别获得花鲈 Wap65-2 基因 3'端序列和 5'端序列, 其重叠区域为 104 bp, 根据这段序列将两段序列拼接后获得一段包含完整开放阅读框的 cDNA 序列。该序列由 1 601 个核苷酸组成 (EMBL 登录号：FR828804), 3'-末端具有 poly (A) 尾。序列包含一个大的开放阅读框, 起始于第 32~34 位的 ATG 起始密码子, 终止于第 1 340~1 342 位的 TGA 终止密码子, 预测编码一个由 436 个氨基酸组成、相对分子质量为 4.87×10^4 的前体蛋白。前体蛋白 N 端 19 个氨基酸为信号肽序列, 成熟蛋白由 417 个氨基酸组成, 相对分子质量为 4.68×10^4。鱼类 Wap65-2 与血红素结合蛋白在结构上有一定的相似性 (Hirayama et al, 2003), 血红素结合蛋白的血红素口袋区内一般有 8 个保守芳香氨基酸残基和 2 个保守组氨酸, 而鱼类 Wap65-2 蛋白则具有其中 7 个芳香氨基酸残基和 2 个组氨酸。在花鲈中, 这些氨基酸残基分别为：Trp207、Tyr212、Phe219、Tyr233、Tyr240、Tyr241、Trp301、His249、His293。NetNGlyc 程序预测揭示, 花鲈 Wap65-2 氨基酸序列中存在 3 个可能的 N-糖基化位点, 分别为 Asn79、Asn124 和 Asn208。

序列比对表明, 花鲈 Wap65-2 与欧洲海鲈 Wap65-2 氨基酸序列同源性最高, 达 80.7%, 与其它鱼类 Wap65-2 同源性为 59.5%~75.5 %。基于全长氨基酸序列的系统进化树构建中, 花鲈 Wap65-2 与欧洲海鲈和真裸南极鱼的 Wap65-2 紧密成簇 (图 1)。

2.2 花鲈 Wap65-2 基因 mRNA 的组织表达特征

花鲈基因组 DNA 经 DNase I 处理后, 进行 Wap65-2 和β-actin 基因 PCR 扩增, 未发现扩增条带, 说明处理后的基因组 DNA 不会对扩增结果产生干扰(图 2)。健康花鲈 Wap65-2 基因 mRNA 主要在肝中表达, 在心和肌肉中也有少量表达, 其他组织未观察到肉眼可见条带(图 2)。

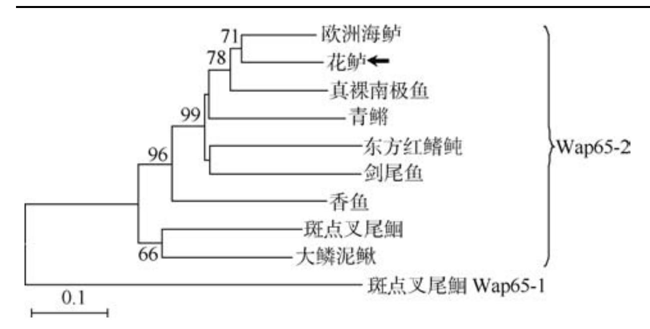


图 1 基于 NJ 法构建花鲈和其它鱼类全长 Wap65-2 蛋白氨基酸序列的系统进化树

Fig. 1 Phylogenetic tree of Wap65-2 gene sequences from the Japanese sea bass (Black arrow) and other fish based on the NJ method

外群为斑点叉尾鮰 Wap65-1(EU030383)。分叉处数值表示 1 000 次重复抽样所得到的置信度, 只显示置信度 60%以上的数值; 标尺长度表明每个位点发生 0.1 次置换。鱼类 Wap65s 序列登录号为: 斑点叉尾鮰 Wap65-1(EU030383)、欧洲海鲈 (BK006867)、花鲈 (FR828804)、真裸南极鱼 (AM408054)、青鳉 (AB195241)、东方红鳍鲀 (NM_001032589)、剑尾鱼 (DQ388969)、香鱼 (AM999340)、斑点叉尾鮰(EU030384)和大鳞泥鳅 (JN230715)。

Ictalurus punctatus Wap65-1 (EU030383) was used as the outgroup. The values at the forks indicate the percentage of trees in which this grouping occurred after bootstrapping the data (1 000 replicates; shown only when >60%). Accession numbers of the Fish Wap65 sequences used are: *Ictalurus punctatus* Wap65-1, EU030383; *Dicentrarchus labrax*, BK006867; *Lateolabrax japonicus,* FR828804; *Harpagifer antarcticus*, AM408054; *Oryzias latipes,* AB195241; *Takifugu rubripes*, NM_001032589; *Xiphophorus hellerii*, DQ388969; *Plecoglossus altivelis*, AM999340; *Ictalurus punctatus*, EU030384; *Misgurnus mizolepis,* JN230715.

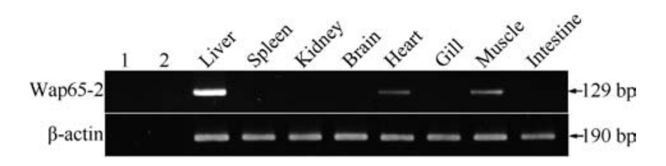


图 2 花鲈 Wap65-2 基因 mRNA 的组织表达特征

Fig. 2 The mRNA expression patterns of Wap65-2 in various tissues of the healthy Japanese sea bass

1: 花鲈基因组 DNA (DNase I 处理); 2: 无模板阴性对照。

1: Japanese sea bass genomic DNA used as template (DNase I digested); 2: Without template, used as negative control.

2.3 与哈维氏弧菌感染相关的花鲈肝 Wap65-2 基因 mRNA 表达变化

哈维氏弧菌感染后 12、24、36 和 48 h 时, qRT-PCR 分析花鲈肝 Wap65-2 基因 mRNA 的表达变化。结果表明, 与健康对照组相比, 12 h 时, 感病花鲈 Wap65-2 基因 mRNA 表达量无显著变化; 24 h 时, 表达量显著增加, 约为对照 6.89 倍; 36 h, 表达量为对照 6.23 倍; 48 h 时, 表达量又恢复至健康对照水平(图 3)。

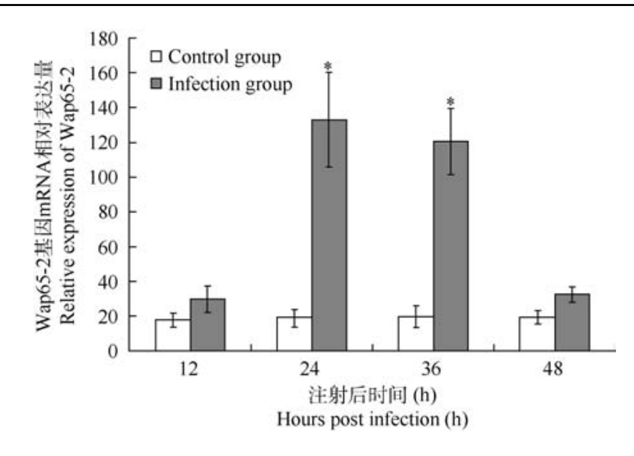


图 3 哈维氏弧菌感染前后花鲈肝组织中 Wap65-2 基因 mRNA 表达变化

Fig. 3 Analysis of liver Wap65-2 mRNA expression changes following a *V. harveyi* infection in the Japanese sea bass

*显著性差异(Indicates a significant difference) (n=4, P<0.05)。

2.4 花鲈 Wap65-2 的原核表达及血清中成熟蛋白的 N-糖基化分析

重组质粒 pET-28a-jWap65-2 经测序表明, 插入片段开读框正确且与已获得的花鲈 Wap65-2 基因核苷酸序列同源性为 100%。重组质粒转化大肠杆菌 BL21 plysS 并经 IPTG 诱导后, SDS-PAGE 检测表明在相对分子质量 4.9×10^4 处出现一条高浓度的诱导表达条带, 与计算机推测的融合蛋白(花鲈 Wap65-2-His-tag)相对分子质量大小 ($4.68\times10^4+0.20\times10^4$) 一致 (图 4)。将该片段切胶纯化后免疫小鼠, 制备抗血清。

Western blot 结果表明, 花鲈血清 Wap65-2 成熟蛋白分子质量约为 6.5×10^4, 比计算值大 1.8×10^4 左右, 经 PNGase F 处理后, 血清 Wap65-2 成熟蛋白分子质量变为 4.7×10^4, 与计算值基本吻合, 揭示 Wap65-2 存在翻译后 N-糖基化修饰 (图 4), 其糖链含量，占总相对分子质量的 28.1%。

2.5 与哈维氏弧菌感染相关的花鲈血清 Wap65-2 蛋白水平变化

分别取 12、24、36 和 48 h 花鲈血清进行 Western blot 分析。与健康对照组相比, 12 h 时, 哈维氏弧菌感染的花鲈血清 Wap65-2 含量无显著变化; 24 h 时, 含量显著增加; 36 h 时含量达到峰值, 为对照含量的 5.33 倍, 48 h 时, 含量回落, 但仍显著高于对照含量 (图 5)。

3 讨 论

Wap65-2 基因目前仅在鱼类中报道。本文首次

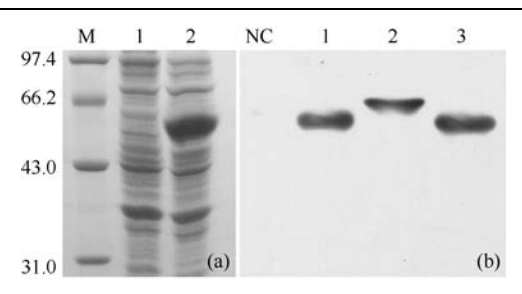


图 4　花鲈 Wap65-2 基因的原核表达 (a) 和血清中成熟肽的糖基化 (b) 验证

Fig. 4　Prokaryotic expression (a) and the confirmation of their posttranslational N-glycosylation (b) of Japanese sea bass Wap65-2

a) SDS-PAGE 检测花鲈 Wap65-2 基因的原核表达产物, 考马斯亮蓝 G-250 染色。M：低相对分子质量标准蛋白质 ($\times10^3$); 1：转化有 pET-28a 质粒的 BL21 plys E, IPTG 诱导; 2：转化有 pET-28a-jWap65-2 重组质粒的 BL21 plys E; b) Western blot 分析验证花鲈血清中 Wap65-2 蛋白的 N-糖基化, ECL 显影。NC：空白阴性对照; 1：原核表达产物; 2：花鲈血清, 未经 PNGase F 处理; 3：花鲈血清, 经 PNGase F 处理。

a) SDS-PAGE analysis of prokaryotically expressed Japanese sea bass Wap65-2; stained by Coomassie brilliant blue G-250. M: protein molecular weight standards ($\times10^3$); 1: *pET-28a* (+)-transformed BL21 plys E, induced by IPTG; 2: *pET-28a-jWap65-2* transformed BL21 plys E, induced by IPTG. b) The confirmation of posttranslational N-glycosylation of Wap65-2 by Western blot, visualized by HRP conjugated-ECL. NC: Negative control; 1: recombinant Wap65-2 produced in *E. coli*; 2. Japanese sea bass serum, not digested by PNGase F; 3: Japanese sea bass serum, digested by PNGase F.

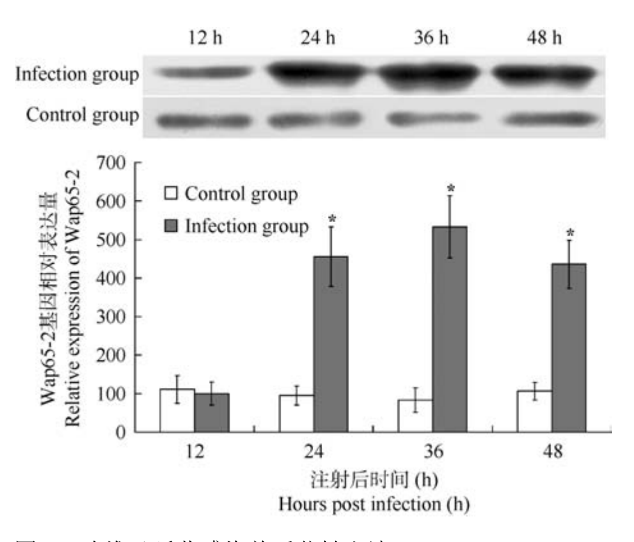


图 5　哈维氏弧菌感染前后花鲈血清 Wap65-2 Western blot 检测

Fig. 5　Western blot analysis of Wap65-2 from Japanese sea bass serum infected with *V. harveyi*

a：各时段花鲈血清 Wap65-2 Western 条带; b：Western 条带灰度值分析。*：显著性差异 (n=4, P<0.05)

a: Western blot of Japanese sea bass serum from respective time periods; b: pray value analysis of Western blot. *: significant difference (n=4, P<0.05)

克隆了花鲈 Wap65-2 基因全长 cDNA 序列。预测编码蛋白具有鱼类 Wap65-2 的典型结构特征, 具有保守的 7 个疏水残基和 2 个组氨酸残基, 这都与血红素结合区的形成有关。序列分析表明，它与欧洲海鲈 Wap65-2 最相似, 氨基酸序列同源性高达 80.7%。组织表达特征分析表明, 花鲈 Wap65-2 基因 mRNA 主要在肝组织中表达, 这与其它鱼类已报道结果吻合(Cho et al, 2012; Clak & Burns, 2008; Hirayama et al, 2003, 2004; Sha et al, 2008; Shi et al, 2010)。花鲈 Wap65-2 糖基，占蛋白总相对分子质量的 28.1%。

文献揭示, Wap65-2 与鱼类细菌性免疫紧密相关。例如, 人工感染鮰爱德华氏菌(*Edwardsiella ictaluri*)后, 斑点叉尾鮰肝组织 Wap65-2 基因 mRNA 表达显著上调 5 倍 (Sha et al, 2008), 蓝鲇肝组织中 Wap65-2 基因 mRNA 表达量也上调 12.5 倍 (Peatman et al, 2008); 人工感染鳗利斯顿氏菌 (*Listonella anguillarum*) 12 h 后, 香鱼肝组织 Wap65-2 基因 mRNA 表达上调 2 倍, 其它组织表达无明显变化(Shi et al, 2010); 大鳞泥鳅在注射 LPS 后, 肝组织 Wap65-2 基因 mRNA 表达量上调 6 倍, 人工感染迟钝爱德华氏菌 (*E. tarda*) 24 h 后, 肝组织中 Wap65-2 基因 mRNA 表达量上调 15 倍, 并且至注射后 96 h 持续高表达 (Cho et al, 2012)。而青鳉注射 LPS 以及欧洲海鲈注射鳗利斯顿氏菌后, 肝组织 Wap65-2 基因 mRNA 的表达无明显变化, 这可能与物种差异有关 (Hirayama et al, 2004; Sarropoulou et al, 2010)。本文结果表明, 花鲈肝 Wap65-2 基因 mRNA 表达变化与哈维氏弧菌感染时程紧密相关, 12 h 后开始表达增加, 24 h 时表达达到峰值, 48 h 时, 表达恢复至健康对照水平。同时, 本文对花鲈血清 Wap65-2 蛋白含量也做了相应分析, 结果表明, 其变化趋势与肝 Wap65-2 基因 mRNA 表达趋势基本一致, 区别在于 48 h 时, 血清 Wap65-2 含量仍维持在较高水平, 而肝组织 Wap65-2 基因 mRNA 表达已回复至健康对照水平, 这与香鱼受鳗利斯顿氏菌感染后血清 Wap65-2 含量变化的趋势吻合 (Li et al, 2011)。关于 Wap65-2 参与鱼类细菌性免疫反应的机制目前尚不明确, 但我们的前期研究揭示, 香鱼 Wap65-2 和补体 C3 间存在特异性相互作用(Shi et al, 2011), 揭示 Wap65-2 可能与鱼类补体激活有关。

综上所述, 本研究首次报道了花鲈 Wap65-2 基因表达与哈维氏弧菌感染时程紧密相关, 为鱼类 Wap65-2 的结构、功能和作用机制的深入研究奠定了基础。

参考文献：

Aliza D, Ismail IS, Kuah MK, Shu-Chien AC, Muhammad TST. 2008. Identification of Wap65, a human homologue of hemopexin as a copper-inducible gene in swordtail fish, *Xiphophorus helleri* [J]. *Fish Physiol Biochem,* **34**(2): 129-138.

Cho YS, Kim BS, Kim DS, Nam YK. 2012. Modulation of warm-temperature-acclimation-associated 65-kDa protein genes (Wap65-1 and Wap65-2) in mud loach (*Misgurnus mizolepis*, Cypriniformes) liver in response to different stimulatory treatments [J]. *Fish Shellfish Immunol,* **32**(5): 662-669.

Clark MS, Burns G. 2008. Characterisation of the warm acclimated protein gene (wap65) in the Antarctic plunderfish (*Harpagifer antarcticus*) [J]. *DNA Seq,* **19**(1): 50-55.

Hirayama M, Kobiyama A, Kinoshita S, Watabe S. 2004. The occurrence of two types of hemopexin-like protein in medaka and differences in their affinity to heme [J]. *J Exp Biol,* **207**(8): 1387-1398.

Hirayama M, Nakaniwa M, Ikeda D, Hirazawa N, Otaka T, Mitsuboshi T, Shirasu K, Watabe S. 2003. Primary structures and gene organizations of two types of Wap65 from the pufferfish *Takifugu rubripes* [J]. *Fish Physiol Biochem,* **29**(3): 211-224.

Huang ZA, Chen J, Lu XJ, Shi YH, Li MY. 2011. Alteration on the expression of ayu coagulation factor X gene upon *Listonella anguillarum* infection [J]. *Zool Res,* **32**(5): 492-498. [黄左安, 陈炯, 陆新江, 史雨红, 李明云. 2011. 香鱼凝血因子 X 基因表达与鳗利斯顿氏菌感染的相关性. 动物学研究, **32**(5): 492-498.]

Kong CJ, Huang ZA, Chen J, Shi YH, Lu XJ. 2012. Molecular cloning, sequence analysis and expression of ayu complement component C9 gene [J]. *Zool Res,* **33**(2): 151-157. [孔铖将, 黄左安, 陈炯, 史雨红, 陆新江. 2012. 香鱼补体成分 C9 基因的克隆、序列分析及表达. 动物学研究, **33**(2): 151-157.]

Li CH, Chen J, Shi YH, Li MY. 2009. Characterization of *Listonella anguillarum* as the aetiological agent of vibriosis occurred in cultured ayu (*Plecoglossus altivelis*) in Ninghai country, China [J]. *Acta Microbiol Sin,* **49**(7): 931-937. [李长红, 陈炯, 史雨红, 李明云. 2009. 宁海地区香鱼弧菌病病原菌鉴定. 微生物学报, **49**(7): 931-937.]

Li CH, Chen J, Shi YH, Lu XJ. 2011. Use of suppressive subtractive hybridization to identify differentially expressed genes in ayu (*Plecoglossus altivelis*) associated with *Listonella anguillarum* infection [J]. *Fish Shellfish Immunol,* **31**(3): 500-506.

Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method [J]. *Methods,* **25**(4): 402-408.

Peatman E, Terhune J, Baoprasertkul P, Xu P, Nandi S, Wang SL, Somridhivej B, Kucuktas H, Li P, Dunham R, Liu ZJ. 2008. Microarray analysis of gene expression in the blue catfish liver reveals early activation of the MHC class I pathway after infection with *Edwardsiella ictaluri* [J]. *Mol Immunol,* **45**(2): 553-566.

Sarropoulou E, Fernandes JM, Mitter K, Magoulas A, Mulero V, Sepulcre MP, Figueras A, Novoa B, Kotoulas G. 2010. Evolution of a multifunctional gene: the warm temperature acclimation protein Wap65 in the European seabass *Dicentrarchus labrax* [J]. *Mol Phylogenet Evol,* **55**(2): 640-649.

Sha ZX, Xu P, Takano T, Liu H, Terhune J, Liu ZJ. 2008. The warm temperature acclimation protein Wap65 as an immune response gene: its duplicates are differentially regulated by temperature and bacteria infections [J]. *Mol Immunol,* **45**(5): 1458-1469.

Shi YH, Chen J, Li CH, Li MY. 2010. Molecular cloning of liver Wap65 cDNA in ayu (*Plecoglossus altivelis*) and mRNA expression changes following *Listonella anguillarum* infection [J]. *Mol Biol Rep,* **37**(3): 1523-1529.

Shi YH, Chen J, Li CH, Yang HY, Lu XJ. 2011. The establishment of a library screening method based on yeast two-hybrid system and its use to determine the potential interactions of liver proteins in ayu, *Plecoglossus altivelis* [J]. *Fish Shellfish Immunol,* **30**(4-5): 1184-1187.

Shi YH, Chen J, Chang HL, Lu XJ, Zhang DM, Li HY, Zhao ZX, Li MY. 2012. Detection of bacterial pathogens in aquaculture samples by DNA microarray analysis [J]. *Aquaculture,* **338-341**: 29-35.

Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. 2011. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods [J]. *Mol Bio Evol,* 28(10): 2731-2739.

Wang BK, Yu JH, Li Y, Ji SW, Xu HS. 2002. Isolation and identification of pathogen (*Vibrio harveyi*) from sea perch, *Lateolabrax japonicus* [J]. *J Fish Sci Chn*, **9**(1): 52-55. [王保坤, 余俊红, 李筠, 纪伟尚, 徐怀恕. 2002. 花鲈弧菌病病原菌(哈维氏弧菌)的分离与鉴定. 中国水产科学, **9**(1): 52-55.]

宁波大学海洋学院海洋生物技术研究团队简介

宁波大学海洋学院海洋生物技术研究团队成立于 2007 年，目前有教授 3 人，副教授 4 人，具有博士学位研究人员 9 人。主要研究方向包括海洋生物基因资源和活性物质的研究与开发，主要研究领域涉及动物行为学、病理学、分子免疫学和海洋药物学等。团队先后主持国家及省部级科研项目 20 余项，得到国家 973 前期专项、国家 863 计划、国家自然科学基金、浙江省科技厅重大项目和教育部博士点基金等的资助，总经费达 1000 余万元。目前课题组已在国内外学术刊物上发表论文 80 余篇，其中 SCI 收录论文 30 余篇。

陈 炯

(宁波大学 应用海洋生物技术教育部重点实验室, 浙江 宁波 315211)

动 物 学 研 究 2012，Oct. 33(5): 487−492 CN 53-1040/Q ISSN 0254-5853
Zoological Research DOI：10.3724/SP.J.1141.2012.05487

中华卵索线虫雌雄寄生后期幼虫基因差异表达分析

吴运梅, 张丽红, 王国秀*

(华中师范大学生命科学学院 遗传调控与整合生物学湖北省重点实验室, 湖北 武汉 430079)

摘要: 索科线虫是一类具有很大生防潜力的昆虫(如棉铃虫等)天敌资源, 但由于其体外培养尚未获得成功, 阻碍了商业化生产和大规模应用, 究其原因主要是体外培养的线虫不能完成雌雄性别分化。因此, 研究该类线虫性别分化机制成为近年本领域的热点课题。该文以中华卵索线虫为实验材料, 采用 mRNA 差异显示的方法, 分析了中华卵索线虫性别分化关键时期雌、雄寄生后期幼线虫的基因表达差异。在雌雄线虫体内得到具有表达差异的基因片段 20 条。其中 8 条在雄虫体内特异性表达, 12 条在雌虫体内特异性表达。利用信息生物学技术对所分离到的差异片段进行了序列分析。其中, Ensembl 分析发现 4 个片段与秀丽线虫 X 染色体具有可匹配片段, 推测这些片段可能是影响中华卵索线虫性别分化的重要基因。这些结果将为后续研究提供思路。

关键词: 昆虫病原索科线虫; 性别分化; mRNA 差异显示
中图分类号: Q959.171; Q344.2; S476.15 **文献标志码:** A **文章编号:** 0254-5853-(2012)05-0487-06

Analysis of differentially expressed genes from female and male postparasitic *Ovomermis sinensis* juveniles

WU Yun-Mei, ZHANG Li-Hong, WANG Guo-Xiu*

(*Hubei Key Laboratory of Genetic and Integrative Biology*, *College of Life Sciences*, *Huazhong Normal University*, *Wuhan* 430079, *China*)

Abstract: Mermithidae, as an important natural predator of pests such as Bollworm, has great potential for natural biological control of invasive pests. Unfortunately, the *in vitro* culture of the nematode has not yet been successful, delaying the commercial application of this pest control method. The key reason for this failure is the inability of the worms to accomplish sex differentiation, sparking a strong interest in this process. Here, we analyzed the differences in gene expression of female and male postparasitic *Ovomermis sinensis* juveniles by mRNA differential display. In total, 20 gene fragments that had differential expression in male and female worms were isolated, including 8 male- and 12 female-specific ones. Bioinformatics methods were employed to analyze sequences of these fragments, in which ensembl analysis shows 4 fragments have comparable parts with *C. elegence's* X chromosome, we speculate those fragments are important genes which influence sex differentiation of *Ovomermis sinensis*, This data provides an idea for further study of the molecular mechanism of sex differentiation in mermithids.

Key words: Mermithidae; Sexual differentiation; mRNA differentially display

中华卵索线虫(*Ovomermis sinensis* Chen)是昆虫病原索科线虫的一种, 属无尾感器纲(Aphasmidia)嘴刺目(Enoplida)索线虫科(Mermithidae)卵索属(*Ovomermis*)(Chen et al, 1991), 广泛寄生于鳞翅目昆虫体内, 如斜纹夜蛾、甜菜夜蛾、菜青虫、黄地老虎、小地老虎及棉铃虫等，其感染期幼线虫可主动寻找并侵染宿主, 寄生后导致宿主不育, 并因脱出使宿主体壁破裂而死亡。因此, 害虫的寄生率即等于其死亡率 (Zhong & Wang, 2001), 生防潜力极大。由于索科线虫在自然界的分布和数量有限, 加之近年化学农药在蔬菜和粮棉油等作物生产上的广泛使用, 在杀死昆虫的同时, 也使农田害虫天敌资源受到很大杀伤, 甚至导致某些昆虫天敌有消失灭种的危险, 在害虫高发的季节更是难有足够线虫

收稿日期：2012-04-05；接受日期：2012-08-31
基金项目：国家自然科学基金(30870350)
*通信作者(Corresponding author)，Tel: 027-67862730, Email: wangguoxiu@ yahoo.com.cn
第一作者简介：吴运梅, 女, 硕士研究生, 研究方向为动物生化与分子生物学; E-mail: wlaug@163.com

资源量与之匹配而起到生物防治的效果。为解决这一问题, 近年国内、外有关学者试图模拟昆虫体内血淋巴环境体外培养索科线虫, 但均未获得成功(Wang et al, 2001), 其主要原因是培养的线虫不能完成性别分化及成熟。因此, 对昆虫病原索科线虫性别分化机制的研究不仅具有重要的理论意义, 而且具有重大的应用价值。

目前, 对索科线虫性别分化机制的研究, 主要停留在形态学、组织学和生理生化等方面(Li et al, 2006), 对其分子机理的探讨尚处在起步阶段。He et al (2009)和 Ren et al (2011a, b)分别克隆了性别决定关键基因 *tra-1* 部分片段和性腺发育相关基因 *vasa* 全长 cDNA 序列; Gao et al (2004)通过 mRNA 差异显示技术和双向电泳技术分别从转录和蛋白水平对雌雄成虫的基因表达进行了分析, 发现雌雄成虫基因表达在 RNA 和蛋白水平均存在明显差异, 但由于当时实验条件的限制, 他们并未进行更深入的研究。然而, 基于近年生理生化和形态学研究进展, 发现寄生后期线虫是其性腺发生和分化的重要时期 (Li et al, 2006), 研究该时期线虫的基因表达状况对于了解中华卵索线虫的性别分化机制具有重要意义, 但对该时期的研究迄今仍很匮乏。因此, 为了解线虫性腺发育的分子机制, 分析雌雄线虫性腺发育关键时期基因表达差异, 在查阅国内外相关文献的基础上, 本研究利用mRNA差异表达技术, 分析了寄生后期早期阶段雌、雄幼虫的基因表达差异, 并利用 24 对引物对该时期的雌雄虫的全部mRNA进行筛查, 试图分离到线虫性腺发育关键期雌雄虫的差异表达基因片段, 从而为探明中华卵索线虫性别分化机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物 中华卵索线虫采自河南省上蔡县麦田, 利用宿主棉铃虫在本实验室长期传代培养备用。

1.1.2 主要试剂 PMD 18-T、Rnase-Free DNase、T4 DNA Ligation Kit、T4 DNA Ligase、Primerscript reverse transcriptase 载体购自 TaKaRa 公司; E.Z.N.A.TM Gel Extraction Kit 购自 Omega bio-tek; Taq DNA polymerase 购自 Fermentas 公司; TRIZOL REAGENT 购自 Invitrogen 公司。其它试剂均为分析纯, 购自国内化学试剂公司。

1.1.3 引物序列 3' 锚定引物: ① H-T11A: 5'-AAGCTTTTTTTTTTTA-3'; ② H-T11C: 5'-AAGCTTTTTTTTTTTC-3'; ③ H-T11G: 5'-AAGCTTTTTTTTTTTG-3'。

5' 随机引物: ① H-AP1: 5'-AAGCTTGATTGCC-3'; ② H-AP2: 5'-AAGCTT CGACT GT-3'; ③ H-AP3: 5'-AAGCTTTGGTCAG-3'; ④ H-AP4: 5'-AAGCTTCTCAACG-3'; ⑤ H-AP5: 5'-AAGCTTAGTAGGC-3'; ⑥ H-AP6: 5'-AAGCTTGCAC CAT-3'; ⑦ H-AP7: 5'-AAGCTTAACGAGG-3'; ⑧ H-AP8: 5'-AAG CTTTTACCG C-3'。

1.2 实验方法

1.2.1 中华卵索线虫雌、雄寄生后期幼线虫的获取 取中华卵索线虫感染期幼虫, 按线虫与宿主 100:1 和 5:1 的比例分别感染棉铃虫, 收集不同时间自然脱出的雌、雄寄生后期幼线虫, 无菌水洗净后置于潮湿沙子中, 放入 26 ℃培养箱培养。

培养 5 d 后取出, 于超净工作台中用 DEPC 水清洗净, 然后取适量装入 DEPC 处理过的 EP 管中, 液氮速冻后, 置于−80 ℃冰箱备用。

1.2.2 中华卵索线虫 RNA 的制备 按 Trizol 试剂使用说明并结合本实验材料的特点, 分别提取雌、雄中华卵索线虫寄生后期幼虫的总 RNA。

1.2.3 RNA 中痕量基因组 DNA 的去除 利用 RNase-free DNase I 去除残留的中华卵索线虫基因组 DNA, RNA 的完整性通过琼脂糖凝胶电泳检测, 利用分光光度计检测 RNA 的浓度和纯度。分别以经过 DNase I 处理的 RNA、RNA 反转录成的 cDNA、超纯水扩增 *actin* 基因, 其中 cDNA 作为阳性对照, 超纯水作为阴性对照, 检测 DNA 是否完全去除。

1.2.4 mRNA 差异显示 PCR cDNA 第一链的合成: 在 0.2 mL 离心管中依次加入: 锚钉引物(20 μmol/L)1 μL, dNTP(10 mmol/L)1 μL, 中华卵索线虫总 RNA 2 μg, RNase-free 水补至 14 μL; 然后 PCR 仪中 65 ℃处理 10 min, 立即冰浴 1 min; 稍离心后, 加入 RNase Inhibitor(40 U/μL)1 μL, 5×First-Strand Buffer 4 μL; 混匀, 稍离心, PCR 仪中 42 ℃ 温育 2 min; 加入 1 μL primscript reverse transcriptase (200 U, 购自 TaKaRa 公司); 轻轻混匀后, PCR 仪中 42 ℃ 温育 50 min; PCR 仪中 70 ℃处理 15 min 以灭活反转录酶; 立即进行第二链的合成或−20 ℃保存。

cDNA 第二链的合成：在 0.2 mL 离心管中加入第一链锚钉引物(20 μmol/L)1 μL, 第二链随机引物(20 μmol/L)1 μL, cDNA 第一链产物 2 μL, 10×PCR 缓冲液 2 μL, 10 mmol/L dNTPs 0.4 μL, 25 mmol/L $MgCl_2$ 1.4 μL, 无菌水补至 19 μL; PCR 仪中, 96 ℃处理 10 min 后, 36 ℃处理 15 min; 然后加入 1 μL Taq 酶(1 U/μL); 按以下程序进行 PCR 扩增：94 ℃5 min, 94 ℃45 s, 40 ℃2 min, 72 ℃1.5 min, 40 循环, 72 ℃10 min; 然后−20 ℃保存备用。

1.2.5　变性聚丙烯酰胺凝胶电泳　分别取 3.5 μL 差异显示 PCR 产物加入 2 μL 变性聚丙烯酰胺凝胶上样缓冲液(95%去离子甲酰胺, 20 mmol/L EDTA, 0.05%溴酚兰, 0.05%二甲苯蓝), 95 ℃变性 3 min, 然后使用 TBE 缓冲液在 6%的变性聚丙烯酰胺凝胶上进行电泳, 400 V 电泳大约 6 h 即可完全分离, 然后取下凝胶, 采用银染的方法显色。该方法快速简便, 分辨率高。

1.2.6　差异 cDNA 片段的回收　用干净手术刀切下雌、雄有表达差异的 DNA 片段, 放入 0.5 mL 离心管中; 加入 20 μLTE 浸泡胶条, 并于 95 °C 处理 20 min, 使凝胶中的 DNA 片段溶入 TE 缓冲液。

1.2.7　差异 cDNA 片段克隆与分析　以浸泡液为模板, 按上述条件对差异片段再扩增; PCR 产物经琼脂糖凝胶回收目的片段后, 与 pMD-19T 载体连接, 然后经大肠杆菌转化、筛选后，送样测序, 所得序列在 NCBI 和 Ensemble 上进行比较分析, 初步确定其功能。

2　结果与分析

2.1　雌、雄寄生后期幼线虫的收集

中华卵索线虫寄生期的营养竞争压力决定其雌、雄性别分化。当感染比率较低时(5:1),营养竞争压力较小、寄生期的时间较长(>10 d), 每条线虫在宿主血淋巴中获得的营养较多, 所以发育成的寄生后期幼线虫虫体较大, 且基本上都为雌虫; 而感染率较高时(100:1), 营养竞争压力较大、寄生期的时间较短(～7 d), 发育成的寄生后期幼线虫虫体较小, 且通常都为雄虫。因此, 根据感染比例、寄生时间及虫体大小来区分并收集雌、雄寄生后期幼线虫。

2.2　中华卵索线虫 RNA 的提取

分别提取雌、雄寄生后期幼线虫总 RNA, 用 Nanodrop 分光光度计分别测定其纯度与浓度。结果 80 mg 线虫材料大约可得 60 μg 的总 RNA, OD260/280 和 OD260/230 值分别为 1.9 和 2.0 左右, 琼脂糖凝胶电泳图中(图 1)28*S*、18*S* 和小 RNA 三条带均清晰可见。

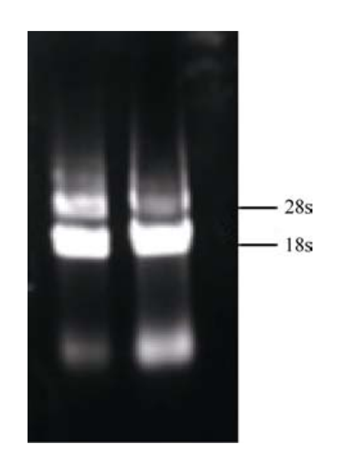


图 1　中华卵索线虫总 RNA
Fig. 1　Total RNA of *Ovomermis sinensis*

2.3　RNA 的 DNA 酶处理

选取浓度和纯度均符合要求的雌、雄虫总 RNA 样品, 用 DNase I 处理, 以除去其中痕量 DNA, 以提高实验准确性。处理后琼脂糖凝胶电泳图中三条带仍清晰可见, 说明纯化后的 RNA 仍具有较高完整性; 且以经 DNase I 处理的 RNA 和阴性对照为模板没有扩增出 *actin* 基因, 而以 cDNA 为模板的阳性对照可扩增出(图 2)。因此, 可以证明经过 DNase I 处理后的 RNA 已完全去除了基因组 DNA。

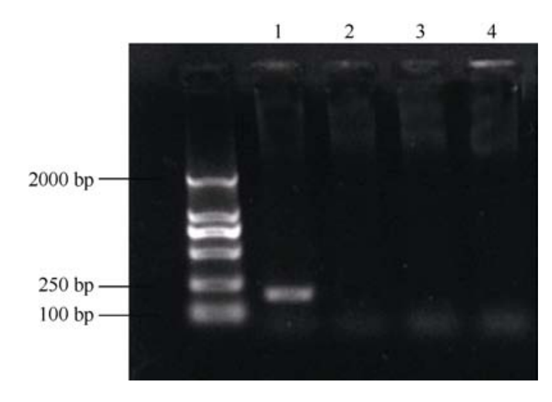


图 2 中华卵索线虫总 RNA 中残留基因组 DNA 的检测
Fig. 2　Detection of DNA in total RNA of *Ovomermis sinensis*
1) 线虫 cDNA 为模板扩增 *actin*; 2) 水作对照扩增 *actin*; 3) 雌线虫 RNA 为模板扩增 *actin*; 4) 雄线虫 RNA 为模板扩增 *actin*。
1) Amplification of *actin* using cDNA of *O. sinensis*; 2) Amplification of *actin* using ultrapure water; 3) Amplification of *actin* using RNA of female *O. sinensis*; 4) Amplification of *actin* using RNA of male *O. sinensis*.

2.4　差异显示 PCR

DD-PCR 产物在 6%的变性聚丙烯酰胺凝胶上

电泳, 银染显示条带(图3)。只有同一条件下三个重复均出现某一条带, 而相比较的另一条件下均未出现该条带, 才被认为是差异条带, 用无菌手术刀切下。共收集到33条差异条带。

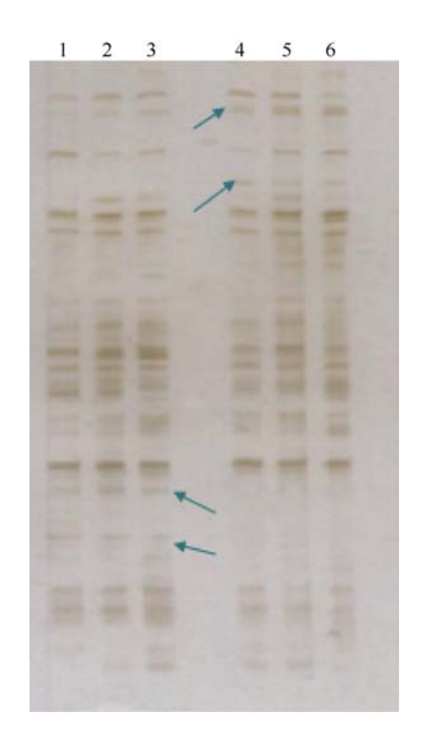


图3 部分DD-PCR结果(箭头指示差异条带)
Fig. 3 Partial result of DD-PCR (arrows show differential fragments)

1-3：雌虫重复DD-PCR产物(H-T11C与H-AP8扩增); 4-6：雄虫重复DD-PCR产物(H-T11C与H-AP8扩增)。

1-3: Repeat DD-PCR of female *Ovomermis sinensis* (Amplification by H-T11C and H-AP8); 4-6: Repeat DD-PCR of male *O. sinensis* (Amplification by H-T11C and H-AP8).

2.5 差异cDNA片段的重扩增、克隆与测序

以切下的差异片段洗脱液为模板, 并分别用相应的锚钉引物和随机引物重新扩增差异条带。33条差异条带中有13条重扩增回收失败, 最终获得20条差异条带。其中8条在雄虫体内特异表达, 12条在雌虫体内特异表达, 此20条带经测序后获得其核苷酸序列。

2.6 差异cDNA片段的比对

将所得核苷酸序列在NCBI上进行blastx分析发现, 其中4条(雌G5-4、雌G8-1、雄C7-3、雄C7-4)与已知序列无任何同源性, 余下16条大多编码假定蛋白(推测蛋白)(表1)。为进一步了解所分离片段的功能信息, 利用ensembl网站, 分析所得序列与秀丽线虫等5个物种基因组序列的同源性, 其中10个片段与所比对5个物种基因组序列无任何匹配片段, 其余10个片段比对结果见表2。其中, 雌G7、雄G8-5、雄C2、雄C7-3 等4个片段与秀丽线虫X染色体具有同源片段(同源性比例分别为 49%、44.87%、36.49%、33%), 雌C6-1、雌G5-3、雌G5-2、雌A5-1、雄A5-2和雄C8-4分别与果蝇3L染色体、果蝇U染色体、秀丽线虫Ⅳ号染色体、秀丽线虫Ⅲ号染色体、秀丽线虫(包括海鞘及酿酒酵母)的rRNA基因和秀丽线虫Ⅱ号染色体具有部分同源性。

3 讨 论

Li et al (2006)通过石蜡横切片观察了中华卵索线虫生殖腺重要发育时期形态变化, 发现寄生后期幼线虫在刚从宿主体内脱出时其生殖腺极小, 很难观察到, 滋养物体占满虫体整个假体腔; 蜕皮后的雌性成虫其生殖腺已发育完全。推测其生殖腺的发育开始于寄生后期幼线虫到蜕皮为成虫这一过程中, 寄生后期是线虫性腺发育的关键时期。为此, 本研究选择寄生后期幼线虫作为差异显示分析的研究材料。

分析雌、雄线虫基因表达状况是探究中华卵索线虫性别分化机制的重要工作, 但由于该线虫的生活周期较长, 难于准确确定线虫性别分化的具体时期, 目前其遗传背景也较为欠缺, 通过普通的基因克隆技术难于获得性别分化相关基因, 因此，长期以来这方面的研究进展缓慢。本研究避开这些困难, 采用 mRNA 差异显示技术分析了线虫性腺发育关键时期雌、雄线虫基因的表达差异, 并在本实验室首次通过该技术分离到差异表达基因片段, 为后续研究奠定了良好基础。

通过mRNA差异显示技术共分离到20条雌、雄寄生后期幼虫差异表达基因片段, 其中8条在雄虫体内特异表达, 12条在雌虫体内特异表达, 通过在NCBI上进行blast分析发现所分离差异片断中, 有4个序列与已知序列不存在任何同源性, 余下的16条片段大多编码的为假定蛋白(推测蛋白)。可能原因为实验材料遗传背景不详, 国内外对该线虫及其近源物种分子生物学研究较少, 数据库上所具有的相似序列较少, 因此，本文所分离的片段大多难以确定其来源和功能。然而, 用Ensembl对所分离到的20条差异序列进行分析时发现雌G7、雄G8-5、

表 1　差异片段的同源性分析

Tab. 1　Homology analyses of DNA fragments derived from DD-PCR products

编号 No.(♀♂)	长度 Length (bp)	序列同源性比对 Sequence homology	GenBank 序列登录号 GenBank Accession no.	*P*	一致性 Identity (%)	相似性 Similarity (%)
雌 C7-1	341	PREDICTED: similar to vomeronasal V1r-type receptor V1rj4	XP_001520335.1	2.2	19/51 (37%)	25/51 (49%)
雌 C6-1	358	PREDICTED: titin-like	XP_002739922.1	1e-06	31/98 (31%)	53/98 (54%)
雌 A5-1	773	ADP, ATP carrier protein	XP_001895160.1	2e-56	104/127(81%)	116/127 (91%)
雌 A5-3	348	predicted protein	XP_002680011.1	6.5	17/60 (28%)	31/60 (51%)
雌 G7	406	GF11865	XP_001959783.1	3e-30	61/118 (51%)	91/118 (77%)
雌 A4-1	445	hypothetical protein TRIADDRAFT_50766	XP_002115731.1	2e-08	27/46 (58%)	36/46 (78%)
雌 G5-3	529	hypothetical protein LELG_02536	XP_001525979.1	1e-06	34/146 (23%)	62/146 (42%)
雌 G5-2	723	predicted protein	EEH52651.1	0.037	43/119 (36%)	51/119 (42%)
雌 C8-2	484	Pc12g04650	XP_002557334.1	0.003	27/49 (55%)	34/49 (69%)
雌 C8-1	573	conserved hypothetical protein	EEE27292.1	0.31	24/77 (31%)	43/77 (55%)
雄 G8-5	367	Probable exocyst complex component Sec15	XP_001893932.1	4e-20	60/90 (66%)	73/90 (81%)
雄 A5-2	423	hypothetical protein Bm1_04940	XP_001892466.1	4e-17	46/64 (71%)	50/64 (78%)
雄 C8-4	533	hypothetical protein	XP_001685961.1	4e-05	28/72 (38%)	38/72 (52%)
雄 A3-1	165	hypothetical protein CaO19.1660	XP_721737.1	6.4	20/50 (40%)	28/50 (56%)
雄 C2	505	conserved hypothetical protein	XP_002433206.1	5e-09	36/108 (33%)	55/108 (50%)
雄 C3-3	470	hypothetical protein Bm1_44150	XP_001900292.1	6e-14	44/105 (41%)	58/105 (55%)

表 2　差异片段的 Ensembl 分析

Tab. 2　Analyses of DNA fragments derived from DD-PCR products by Ensembl website

编号 No. (♀♂)	同源性 Homology	ID	物种/染色体定位 Species/Chromosome localization				
			C. elegans	*C. intestinalis*	*C. savignyi*	*Drosophila*	*Saccharomyces*
雌 G5-3	*Lodderomyces elongisporus* NRRL YB-4239 hypothetical protein	XM_001525929.1	no	no	no	U	no
雌 G7	*Drosophila melanogaster* kinesin-73 mRNA	U81788.1	X	no	no	2R	no
雌 A5-1	*Caenorhabditis elegans* Adenine Nucleotide Translocator family member	NM_069326.2	Ⅲ	4Q	no	X	Ⅱ
雌 C6-1	PREDICTED: *Saccoglossus kowalevskii* titin-like	XM_002739876.1	no	no	no	3L	no
雌 G5-2			Ⅳ	no	no	no	Ⅳ
雄 A5-2	*Brugia malayi* hypothetical protein	XM_001892431.1	I	未定	no	no	Ⅻ
雄 C2	*Pediculus humanus corporis* conserved hypothetical protein	XM_002433161.1	X	no	no	no	no
雄 C7-3			X	no	no	no	no
雄 C8-4	*Leishmania major* hypothetical protein	XM_001685909.1	Ⅱ	no	no	no	no
雄 G8-5	*Brugia malayi* Probable exocyst complex component Sec15	XM_001893897.1	X	no	no	no	no

字母和罗马数字表示能与本文所分离片段相匹配的基因定位的染色体编号。

Letters and roman numerals in the table show chromosome numbers where genes are located, which have corresponding fragments in this study.

雄 C2、雄 C7-3 等 4 个片段与秀丽线虫 X 染色体具有同源片段。雌 G7 片段与果蝇中定位于 2R 染色体上的基因 *khc-73* 和秀丽线虫中定位于 X 染色体上的基因 *klp-4* 同源性都较高(分别为 50%和 49%)，其中 *khc-73* 编码蛋白 kinesin-73、*klp-4* 编码蛋白 KLP-4，且秀丽线虫中 KLP-4 和果蝇中 kinesin-73 为直系同源蛋白，说明本实验所分离的中华卵索线虫的雌 G7 片段可能与秀丽线虫中的 *klp-4* 基因和果蝇中的 *khc-73* 基因为同源基因。而 *klp-4* 位于秀丽线虫 X 染色体上，通过 RNA 干扰技术发现 KLP-4 功能缺失个体并无任何发育异常，因此，KLP-4 蛋白在秀丽线虫发育和行为中扮演的具体角色还未确定(Ensembl 网页)。但是，基于序列相似性分析，推测 KLP-4 可能在神经元的发育和功能方面具有一定作

用。至于该基因是否与线虫性别分化和性腺发育有关还需进一步证实。

秀丽线虫中 X 染色体对线虫的性别分化方向具有重要作用, X 染色体上的基因 *fox-1* 和 *sex-1* 为性别分化方向控制的初始信号(Akerib & Meyer, 1994), 它们通过控制性别决定基因 *xol-1* 的活性来实现对 X 染色体上一系列性别分化级联通路基因的控制(Hodgkin, 2002; Large & Mathies, 2007)。由此可见, 秀丽线虫 X 染色体在性别分化中具有关键作用, 而通过 ensembl 分析, 本文所分离的上述 4 条差异表达片段均与秀丽线虫 X 染色体上的片段具有较大同源性, 提示上述四条片段可能与中华卵索线虫性别分化有关, 但这些片段是否为性别分化关键基因, 尚待进一步研究。

其余所分离的 10 条片段通过 Ensembl 分析未发现与所分析 5 个物种具有同源性。推测可能为中华卵索线虫特有或新基因序列, 在后续研究中可结合 cDNA 文库分离出基因全长进行功能研究, 或作为索科线虫特有的分子标记将为其后续研究奠定基础。

参考文献:

Akerib CC, Meyer BJ. 1994. Identification of X chromosome regions in *Caenorhabditis elegan* that contain sex-determination signal elements [J]. *Genetics,* **138**(4): 1105-1125.

Chen G, Jian H, Ren HF, Pan CS. 1991. A new species of parasitic nematode of armyworm: *Ovomermis sinensis* sp. nov. (Nematoda: Mermithidae) [J]. *Acta Zootax Sin,* **16**(3): 270-277. [陈果, 简恒, 任惠芳, 潘沧桑. 1991. 寄生于粘虫的卵索线虫属一新种-中华卵索线虫(线虫纲: 索科). 动物分类学报, **16**(3): 270-274.]

Gao Y, Wang GX, Chen SL. 2004. Preliminary analysis on dissoluble protein of *Ovomermis sinensis* adults by Z-D PAGE [J]. *Acta Zool Sin,* **50**(1): 141-144. [高原, 王国秀, 陈思礼. 2004. 中华卵索线虫雌雄成虫可溶性蛋白双向电泳分析. 动物学报, **50**(1): 141-144.]

He JF, Wang WN, Zhou QC, Wang GX. 2009. cDNA cloning and quantitative analysis by real-time RT-PCR of *tra-1* gene in *Ovomermis sinensis* [J]. *Acta Phytophyl Sin,* **36**(4): 324-328. [贺俊飞, 王伟娜, 周青春, 王国秀. 2009. 中华卵索线虫 *tra-1* 基因 cDNA 片段的克隆及实时定量表达分析. 植物保护学报, **36**(4): 324-328.]

Hodgkin J. 2002. Exploring the envelope: Systematic alteration in the sex-determination system of the nematode *Caenorhabditis elegans* [J]. *Genetics,* **162**(2): 767-780.

Large EE, Mathies LD. 2007. Chromatin regulation and sex determination in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Trends Genet,* **23**(7): 314-317.

Li JL, Wang GX, Wang W, Liu XS, Qiao ZX, Zhao S. 2006. Changes of the morphological and chemical substances of the *Ovomermis sinensis* during gonadial development [J]. *J Central Chn Normal Univ: Nat Sci*, **40**(2): 265-269. [李俊莉, 王国秀, 汪威, 刘绪生, 乔志仙, 赵珊. 2006. 中华卵索线虫生殖系统发育程中形态和主要化学物质含量的变化. 华中师范大学学报: 自然科学版, **40**(2): 265-269.]

Ren S, Chen C, Liu X, Wang GX. 2011a. Molecular cloning and expression analysis of *vasa* gene in *Ovomermis sinensis* [J]. *Acta Phytophyl Sin,* **38**(4): 333-338. [任爽, 陈冲, 刘绪生, 王国秀. 2011b. 中华卵索线虫 *vasa* 基因的克隆及其表达模式分析. 植物保护学报, **38**(4): 333-338.]

Ren S, Wang WN, Zhao NN, Ai H, Wang GX. 2011b. Research progresses and prospects of nematode, *Ovomermis sinensis* [J]. *Chn J Appl Entomol,* **48**(3): 716-719. [任爽, 王伟娜, 赵娜娜, 艾欢, 王国秀. 2011a. 中华卵索线虫的性别分化分子机理研究进展. 应用昆虫学报, **48**(3): 716-719.]

Wang GX, Chen QH, Chen G. 2001. *In Vitro* cultivation of the Entomogenous nematode *Ovomermis sinensis* [J]. *Acta Zool Sin,* **47**(2): 235-239. [王国秀, 陈曲侯, 陈果. 2001. 中华卵索线虫的体外培养. 动物学报, **47**(2): 235-239.]

Zhong YL, Wang GX. 2001. Advances in the studies on mermithidae in China [J]. *Chn J Biol Control*, **17**(1): 35-39. [钟玉林, 王国秀. 2001. 我国昆虫寄生索科线虫研究近况. 中国生物防治, **17**(1): 35-39.]

动 物 学 研 究 2012，Oct. 33(5): 493−497 CN 53-1040/Q ISSN 0254-5853
Zoological Research DOI：10.3724/SP.J.1141.2012.05493

联体小鼠在联体状态下的生理变化

张富祥, 杨亦彬, 柯贵宝, 陈 颖, 徐鑫梅, 谭州科, 容 松*

(遵义医学院 肾病中心器官移植实验室, 贵州 遵义 563003)

摘要：该研究旨在建立联体小鼠模型并评估小鼠应对联体状态时的生理变化。选取 13 对同基因联体小鼠, 在两只小鼠肘关节远端 4～5 mm 处, 沿着肱骨和肋骨侧面直到腰围线末端, 连接皮肤和皮下组织, 建立联体模型, 术后观察联体小鼠运动变化、体重、粪便皮质酮活性及血液交换率等。结果发现：术后联体小鼠出现兴奋、焦虑等特征性运动失常, 随后数周小鼠活动逐渐适应联体状态, 120 天内无一死亡; 术后三天体重下降, 术后一月恢复至正常; 术后粪便中皮质酮代谢物水平快速升高, 至第 75 天降至正常; 检测术后其中三对联体小鼠之间的血液交换率, 结果基本正常, 第 12 周血液完全交换率分别为 63、46 和 107 min。该结果提示小鼠能够很好地适应联体状态, 该模型具有广泛的应用前景。

关键词：粪便中皮质酮; C57BL/6 小鼠; 适应; 伊文思蓝; 联体小鼠模型
中图分类号：Q4; Q57 **文献标志码**：A **文章编号**：0254-5853-(2012)05-0493-05

Mice cope with parabiosis — Assessment of their physiological changes of life

ZHANG Fu-Xiang, YANG Yi-Bin, KE Gui-Bao, CHEN Ying, XU Xin-Mei, TAN Zhou-Ke, RONG Song*

(*Department of Nephrology*, *Laboratory of Organ Transplantation*, *Zunyi Medical College*, *Zunyi Guizhou* 563003, *China*)

Abstract: The purpose of this study was to establish a parabiotic mice model and assess the physiological changes of the mice under the parabiotic state. Thirteen pairs of isogenic partners were studied. The model was created by preparing a bridge of skin and subcutaneous tissues between the two mice starting distal of the elbow joint along the humerus along the lateral costal region until the end of the waist line. Physiological, social and affective qualities of life were studied in the mice through behavioural observations for 120 days following the parabiotic surgery. During the first 2−3 days following the operation, the animals suffered from severe pain and distress. During the following days and weeks, the physiological system began to recover and the animals displayed behavioral adaptations to the parabiotic condition. All animals survived at day 120. At three days post operation, the body weight began to decrease. Following this, the animals experienced a continual body weight recovery and reached pre-surgical measures at about 30 days post op. Forty-eight h post op., faecal corticosterone-metabolites were extremely elevated, but their levels returned to two to four times of levels in control females within 72 hours post op. The faecal corticosterone-metabolite levels decreased near to control values on day 75. Out of the 13 pairs, the blood exchange rate of three parabiotic partners was tested, with the result being normal post op. After 12 weeks, the total blood exchange between both partners needed 63 or 46 or 107 min, respectively. These results demonstrated that the animals could adapt behaviourally to the parabiotic situation. Therefore, this parabiosis mouse model may provide useful insights in many research areas, such as transplantation immunity, hematological system and metabolism, etc.

Key words: Faecal corticosterone; Mouse; Adaptation; Evans Blue; Parabiotic mice model

联体(parabiose)模型早在一百多年前就已建立(Bauknecht, 1980; Sauerbruch & Heyde, 1908; Schmidt, 1922), 即通过外科血管吻合术把两只动物的循环系统连接起来从而完成血液交换。Bunster &

收稿日期：2012-02-28；接受日期：2012-05-20
基金项目：国家自然科学基金(81160096)
*通信作者(Corresponding author)，E-mail: songrong@hotmail.com

Meyer (1932)改良了这种模型，仅连接两只小鼠或大鼠的皮肤，从而明显减轻了动物术后的普遍性疼痛和不适，并减少了术后的照料。Hill (1932)也发现两只动物在伤口愈合过程中，新生毛细血管会互相交叉生成，从而完成两者之间的血液交换。因此，这种改良的联体模型被广泛应用于内分泌、新陈代谢、血液系统、传染及移植等研究中。

与上述结果相反，英国实验动物科学协会(LASA, 1990)指出由于联体动物持续性的疼痛和伤害，死亡率可能会增加，但这仅仅是基于对预期的判断。Aicher et al (2007)指出由于对联体动物的疼痛和痛苦评估的基本原则不同，阻碍了利用这种模型对研究项目的合理评价。Abe et al (2004)则报道联体生活的小鼠有极好的健康状况，死亡率为零。Broom (2001)、Knierim et al (2001)、Panksepp（1998）、UFAW (2006) et al 利用联体动物模型在其他领域进行了研究，如神经系统科学、实验心理学、动物生理学、兽医学和动物福祉。因此，本实验把观察的重点集中在小鼠应对联体状态下的生理变化，以进一步证实该模型创建的合理性，同时也为该模型在多领域研究中的应用提供生理依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物

近交系 C57BL/6 雄/雌小鼠，70 d，体重 19～21 g，购自第三军医大学大坪医院实验动物中心(合格证号：ScXK 渝 20090103)，养殖于 37 cm×20 cm×18 cm 的聚碳酸酯鼠笼，室温 (21±2) ℃，相对湿度～50%，7:00—19:00 给予光照。以耳朵打孔或蓝墨水涂抹颈部作为标记。

1.2 仪器

Beckman DU80 紫外分光光度计(美国)，Olympus cx21 光学显微镜(日本)，Multiskan Spectrum 全波长酶标仪(美国)。

1.3 健康评估

在手术前、后一周每天评估每只小鼠的健康状态；以后每周三次(9:00—12:00)测量体重，精确到 0.5 g；评估循环系统和呼吸系统疾病；清洁皮肤、毛发以及身体的所有开口，包括眼部、嘴巴以及肛门生殖器部位；观测粪便状况。

1.4 联体手术

1.4.1 术前，小鼠共同生活 2～3 周。选择 13 对体重和年龄相近，具良好健康状态，正常生物周期和群居适应性的小鼠。

1.4.2 根据 Bunster & Meyer (1932)的方法，用异氟烷麻醉小鼠，在肘关节远端 4～5 mm 处沿肱骨和腋下侧面剪开至腰围线末端，用 5/0 线连续缝合配对动物皮肤和皮下组织。与 Bunster & Meyer (1932)方法不同的是：不固定肩胛区的肌肉和组织，仅利用前腿的有限固定防止联体小鼠的翻转。对照组小鼠只切开皮肤并缝合，不做联体。术后，两只联体小鼠肋骨区域的皮下组织缝合并保留～2 cm 的活动距离。这样，肩部的侧向运动可以弥补因前上肢的狭窄固定所导致的运动受限。这有利于联体小鼠之间的独立运动，如自我梳理、清洁肛门生殖器区域及食物摄取等。术后维持小鼠体温并一次性给予安乃近钠 10 mg 镇痛。

1.5 肾上腺皮质活性

10:00—12:00 收集粪便，通过酶免疫分析法测定粪粒中皮质酮代谢物的含量(Ambrée et al, 2006)。

1.6 联体小鼠观察及运动评估

通过摄像机及红外光对鼠笼进行 24 h 录像以评价小鼠的自然生理状态，并将录像时间压缩成 6:1 制成新片。由于时间被压缩，<0.3 s 的行为方式无法评估，因此原始时间 5 min 内的频繁行为需重新观看原始记录。通过目测法分析该录像记录，观察小鼠在手术后第 1～65 天的笼外自发活动，并记录联体小鼠交叉，站立和转圈频率的变化。

1.7 血液交换率

联体小鼠之间的血液交换率在术后第 12 周的 10:00—12:00 进行评估。实验 0 min 时，从联体左侧(俯卧位)小鼠尾静脉注入 4%伊文思蓝溶液 150 μL，对照组做同样处理；在第 4、9、17、25 和 42 min 分别穿刺两只联体小鼠眼球后静脉取血 0.1 mL，离心分离出血清，甲酰胺 1:8 稀释，使用 620 nm 分光光度计测量血清中伊文思蓝的量；使用 Graphpad Prism 5.0 计算注入小鼠伊文思蓝溶液的相关系数(r)和回归斜率(B)，并基于伊文思蓝清除斜率估算联体小鼠之间的血液交换率。

2 结 果

2.1 联体小鼠的生理反应

手术后两天内，连体小鼠的自然生活质量严重受损。麻醉苏醒后数小时内高度兴奋，出现特征性呼吸及循环紊乱；术后 12～48 h，联体小鼠承受巨大的疼痛，无法正常睡眠、饮食，体重开始下降；术

后 48 h 下丘脑-垂体-肾上腺轴 (HPA-axis) 极其活跃, 粪便中的皮质酮代谢物增加; 术后 72 h 粪便中皮质酮代谢物水平达到对照组的 2～4 倍(表 1); 术后 24 h 当小鼠拉伸皮桥清洁肛门生殖器区域时未出现疼痛迹象; 术后一周连接处皮肤愈合无并发症。

表 1 小鼠粪便皮质酮代谢物测定

Tab. 1 Faecal Excretion of Corticosterone-Metabolites

雌性成对小鼠粪便中皮质酮代谢物的量 (ng/50 mg) Faecal excretion of Corticosterone-Metabolites in female pairs	例数 *N*	平均数 Mean	标准差 *SE*	最大值-最小值 Max-Min
术后 24 小时排泄量 Excretion 24 h post op.	13	901	218	811–1225
术后 48 小时排泄量 Excretion 48 h post op.	13	834	165	677–1006
术后 72 小时排泄量 Excretion 72 h post op.	13	310	159	154–437
术后 96 小时排泄量 Excretion 96 h post op.	13	160	25	134–185
术后第 8 天排泄量 Excretion on day 8 post op.	13	320	107	198–400
术后 15 天到 75 天排泄量 Excretion between day 15 and 75 post op.	35	114	61	34–283
健康雌性对照组排泄量 Excretion in healthy control females	42	95	30	32–152

粪便中皮质酮代谢物含量于术后第 4 天减少至接近对照组水平(图 1); 术后第 8 天短暂升高(200～400 ng/50 mg 粪便); 术后第 15～75 天, 出现不规则浓度, 提示在此期间肾上腺轴的反复短暂活跃; 术后第 75 天, 与健康对照组小鼠比较, 已无显著性差异(P>0.05)。

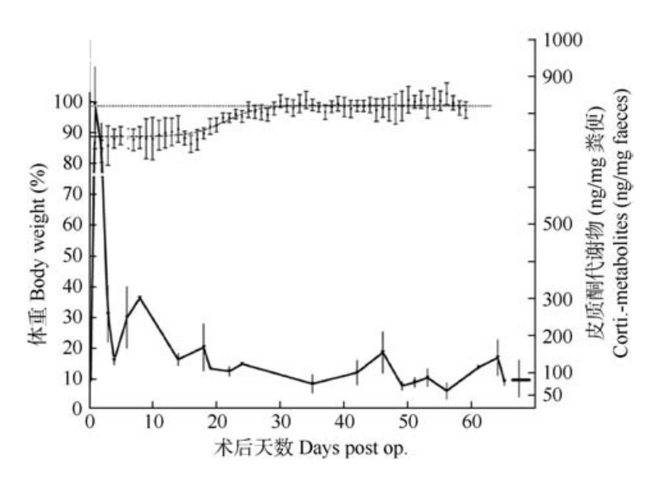


图 1 联体手术后小鼠体重(左)及粪便中皮质酮代谢物变化(右)

Fig. 1 Body weight (in % of weights before operation) of parabiotic mice pairs post op.(left) and corticosterone-metabolites (ng) in 50 mg of faeces (right)

2.2 联体小鼠体重变化

术后第三天, 小鼠出现体重减轻、脱水及较低频率短暂的疼痛; 术后第 8～15 天体重减轻达到最大(图 1); 术后第 10 天, 小鼠变得活跃和敏捷, 并开始恢复体重; 术后一月所有小鼠完全恢复体重并未表现明显的伤害标志。但是, 其中一只联体小鼠表现苍白的耳朵和爪子, 提示该小鼠极有可能遭受了联体中毒(parabiotic intoxication)。

2.3 联体小鼠运动状况

术后 72 h, 小鼠已无疼痛及疾病表现, 但焦虑所致活动失常一直持续到术后第 10～15 天, 小鼠倾向于待在窝内, 绕着伙伴小心移动并频繁梳理, 且散步减少, 食欲减退。术后第 12～15 天, 焦虑基本消失, 小鼠运动频繁。术后第 1～65 天联体小鼠在笼外的自发活动, 如交叉, 站立和转圈频率变化见图 2。术后第 1～5 天, 频率变化极不明显, 随后达到低平台期, 直至术后第 10～15 天; 此后交叉、站立频率持续增加, 逐步达到满足其食物需求的运

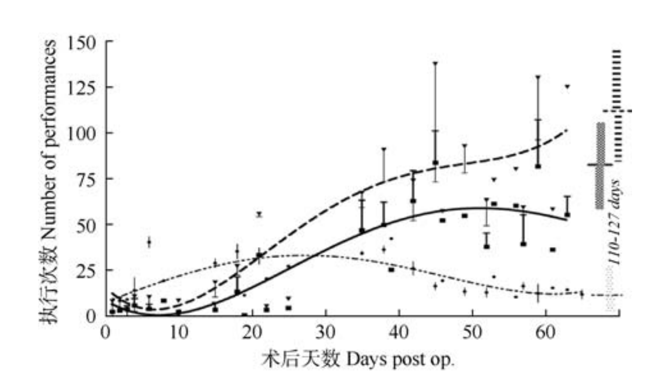


图 2 联体小鼠手术前、后在笼外的自发活动

Fig. 2 Total number of locomotion patterned movements performed by parabiotic pairs during a 12 min open field test

每次观察 12 min (mean±*SE*)：----站立;—交叉; ·····转圈。

The total number of locomotive movements observed on different days before and following parabiotic surgery in the parabiotic pairs (mean±*SE*): “Standing up” (----，ashed line), “crossed fields” (—，olid line), “turning around” (·····， otted line).

动量; 术后第(24±12)天联体小鼠状态迅速恢复, 转圈频率保持高位>20 天; 术后第 40～60 天, 转圈频率下降, 而交叉、站立达到平台期, 且在术后第 110～120 天之间也可观察到该情况。总体来说, 连体小鼠的运动成功克服了其联体障碍。

2.4 联体小鼠之间的血液交换率

血液中的伊文思蓝在 3 只独立的假手术雌鼠(1,2,3)(表 2)中以单峰形式消失, 而在联体小鼠中则以双峰形式消失, 即在注射早期(4～25 min), 联体小鼠表现伊文思蓝的快速消失时相, 随后(25～42 min)出现延迟消失时相, 且该时相类似于对照组出现的单峰。回归方程($Y=A+Bx$)以及伊文思蓝在不同小鼠早期、晚期消失时相的半衰期见表 2。综合评估 3 对联体小鼠(I, I, II)并计算相关系数(r), 其延迟时相的相关系数很低(r=0.58)。注射伊文思蓝的联体小鼠, 其伊文思蓝在早期时相消失很快, 生物半衰期为 31～40 min, 这是由于一部分伊文思蓝进入了未注入伊文思蓝小鼠的体内, 而延迟时相伊文思蓝的消失则主要是由两只小鼠分解代谢和排泄引起的, 其排泄速度与对照组相似。联体小鼠之间的血液交换率是根据伊文思蓝在第一时相(4～25 min)的清除率来估算的, 扣除伊文思蓝晚期时相(25～42 min)的排泄率加以修正, 即为由一只小鼠转移到另一只小鼠的那部分伊文思蓝的清除率。三对联体小鼠之间的血液完全交换分别需要 63、46 和 107 min。

表 2 对照组和联体左侧小鼠血清中伊文思蓝的消除

Tab. 2 The elimination of Evans-Blue in the serum of the left mouse of the parabiotic pairs and in controls

时相 Phase		I	II	III	1	2	3
早期时相 Early phase	$Y_{4\text{-}25}=A+Bx$	=235−3.46x	=296−4.74x	=258−2.83x	=231−1.52x	=239−1.52x	=294−1.69x
	相关系数 r	−0.99	−0.98	−0.96	−0.83	−0.82	−0.75
	交换率 $hlt_{4\text{-}25}$ (min)	34	31	40	71	79	87
晚期时相 Late phase	$Y_{25\text{-}42}=A+Bx$		=215−1.57x			=244−1.38x	
	相关系数 r		−0.58			−0.45	
	交换率 $hlt_{25\text{-}42}$ (min)	69	69	69	88	88	88
	完全交换率 hlt (min)	63	46	107			

通过回归方程式($Y=A+Bx$)、相关系数(r)、左侧联体小鼠(I, II, III)和假手术组小鼠(1, 2, 3)血清中伊文思蓝的半衰期来估算早期时相(注射后 4～25 min)和晚期时相(注射后 25～42 min)的消除量, 联体小鼠间的血液交换率=$0.5\times A/(B_{4\text{-}25}\text{-}B_{25\text{-}42})$。

Estimations of Evans Blue levels during the early disappearing phase (4−25 min. after infusion) or during the late disappearing phase (25−42 min. after infusion). Data represents the regression equations ($Y=A+Bx$), coefficients of correlation (r) and half-life times (hlt) of Evans Blue disappearance in the serum of the left mouse of the parabiotic pairs (I, II, III) and in three sham operated mice (1, 2, 3). Blood exchange rate between parabiotic partners (Blood-hlt) was calculated by=$0.5\times A/(B_{4\text{-}25}-B_{25\text{-}42})$.

3 讨 论

早在一百年前,小鼠联体模型就已被应用于多个领域。然而自从 1990 年英国实验动物科学协会(LASA, 1990)提出联体模型对动物的伤害后, 就影响了该模型的进一步使用。本实验重新建立并评估了小鼠联体改良模型, 结果显示小鼠具备适应联体生活的能力。术后第 60 天, 最迟第 110～140 天, 联体小鼠即可以完全习惯联体过程并达到平衡状态, 且小鼠健康活跃, 并无任何生活质量降低的迹象, 直至术后第 120 天, 小鼠的死亡率均为零, 这与 Pope（1968) 报道一致。

实验表明, 联体小鼠术后的剧烈疼痛持续时间短暂, 且不导致死亡。所有小鼠均能适应联体状态, 满足自身需要并协调与伙伴的关系, 而 LASA 手册则忽视了这一观察结果。正如在本小鼠联体实验中所得到的, 对于他们处理联体状态下生理反应能力的认识确实需要客观的观察。

从新陈代谢、内分泌系统或者神经免疫系统方面研究生理改变的实验(Panksepp, 1998; Broom, 2001; Knierim et al, 2001; UFAW, 2006), 都只得到一些大概的信息。然而, 我们仍能够区分 3 不同时期, 即最初时期, 持续约 3 天, 此间小鼠睡眠被剥夺, 无法正常进食进水, 体重减轻, 粪便中皮质酮代谢物明显增加, 这些都表明小鼠遭受手术创伤; 随之而来的是第二个时期, 持续一到两个月, 此间小鼠体重逐渐恢复, 皮质酮代谢物含量逐渐下降, 性周期逐渐规则, 表明联体小鼠经历了适应特异生

理的时期；第三个时期大约至术后第 120 天左右，此间这些适应过程进一步完善，动物开始能够应付各种障碍。

在 10:00—2:00 可以检测到粪便中有大量的皮质酮代谢物，这表明下丘脑-垂体-肾上腺轴(hpa-axis)的激活 (Touma et al, 2003; Dallmann et al, 2006; Lepschy et al, 2007) 。也通过不同的方法得到了类似的结果。经过联体手术，粪便中皮质酮代谢物的含量明显升高，是标准水平的 8 到 12 倍，并持续了 48 h。Voigtländer et al (2006)在进行 C56BL/6 雌鼠朊病毒病实验后也报道了类似的变化。然而，72 h 后，联体小鼠肾上腺轴的活动降低，粪便中皮质酮代谢物水平迅速降到正常水平。这和 Ambrée et al (2006) 报道的相同。在术后第 15 天和 75 天之间，只有 20%的小鼠会显示出一个短期的肾上腺轴的激活。这些结果也与 Harris et al (1997) 得出的结论相符合，同时他证实雌性 C57BL/6 联体小鼠术后 50 天时肾上腺的重量并没有减轻。但在金仓鼠雄性联体小鼠却不同，术后 5 周，它们肾上腺的重量比对照组高 25%(Seibel & Schweisthal, 1972)。

联体的两只小鼠之间完成全部的血液交换大约需要 1 个小时, Matsumoto et al (1972)也证实了这个速度，因此联体的动物会永远受另一方血液成分的影响。不过 Matsumoto 指出，这个影响是非常细微的，因为一种血液成分的生物半衰期远远小于所估计的联体生物之间的血液交换速率。对于生物半衰期较长的物质来说，有可能与交换同时发生，正如在雌-雌联体中所观察到的性周期。

本实验在 Bunster & Meyer (1932)模型基础上进一步简化改良，使小鼠有更大的自主活动能力，能很好地适应联体状态，模型对动物的伤害在合理范围，完全符合各国制定的动物保护/福利法案。本实验为这种联体模型在内分泌、新陈代谢、血液系统、传染、移植等众多领域的应用提供了支持。

参考文献：

Abe S, Boyer C, Liu X, Wen FQ, Kobayashi T, Fang Q, Wang X, Hashimoto M, Sharp JG, Rennard SI. 2004. Cells derived from the circulation contribute to the repair of lung injury [J]. *Am J Res Crit Care Med,* **170**(11): 1158-1163.

Aicher A, Rentsch M, Sasaki K, Ellwart IW, Fändrich F, Siebert R, Cooke JP, Dimmeler S, Heeschen C. 2007. Nonbone marrow-derived circulating progenitor cells contribute to postnatal neovascularization following tissue ischemia [J]. *Circ Res,* **100**(4): 581-589.

Ambrée O, Touma C, Götz N, Keyvani K, Paulus W, Plame R, Sachser N. 2006. Activity changes and marked stereotypic behavior precede Aß-pathology in TgCRND8 Alzheimer mice [J]. *Neurobiol Aging,* **27**(7): 955-964.

Bauknecht B. 1980. Parabiose, Geschichte und Bibliographie von den Anfängen bis zur Gegenwart [M]. Neumünster: Wachholtz, Kieler Beiträge zur Geschichte der Medizin und Pharmazie 17, ISBN 3-529-06217-0.

Broom MD. 2001. Coping with Challenge: Welfare in Animals Including Humans [M]. Berlin: Dahlem University Press.

Bunster E, Meyer R. 1932. An improved method of Parabiosis [J]. *Anatomical Rec,* **57**(4): 339-343.

Dallmann R, Tonma C, Palme R, Albrecht U, Steinlechner S. 2006. Impaired daily glucocorticoid rhythm in Per (Brd) mice [J]. *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol,* **192**(7): 769-775.

Harris RBS, Zhou J, Weigle DS, Kuijper JL. 1997. Recombinant leptin exchanges between parabiosed mice but does not reach equilibrium [J]. *Am J Physiol,* **272**(6 Pt2): R1800-R1808.

Hill RT. 1932. Blood exchange and hormonic reactions in parabiotic rats [J]. *J Exp Zool,* **63**(1): 203-234.

Knierim U, Carter CS, Fraer D, Gärtner K, Lutgendorf SK, Mineka S, Panksepp J, Sachser N. 2001. Group report: Good welfare improving quality of life [M] // Broom MD. Coping with Challenge: Welfare in Animals Including Humans. Berlin: Dahlem University Press.

LASA. 1990. The assessment and control of severity of the scientific procedures on laboratory animals [J]. *Laborat Anim,* **24**(2): 97-30.

Lepschy M, Touma C, Hruby R, Palme R. 2007. Non-invasive measurement of adrenocortical activity in male and female rats [J]. *Labora Anim,* **41**(3): 372-387.

Matsumoto J, Sogabe K, Hori-Santiago Y. 1972. Sleep in Parabiosis [J]. *Experientia,* **28**(9): 1043-1044.

Panksepp J. 1998. Affective Neuroscience, the foundations of human and animal emotions [M]. Oxford: Oxford University Press.

Pope RS. 1968. Lifespan and weight of strain 129 mice in parabiotic union [J]. *Transplantation,* **6**(8): 934-938.

Sauerbruch F, Heyde M. 1908. Über Parabiose künstlich vereinigter Warmblüter [J]. *Münchner Med Wochenschrift,* 55(1): 153-156.

Schmidt G. 1922. Stand und Ziele der Parabioseforschung, auf Grund eigener Untersuchungen [J]. *Dtsch Z Chir,* **171**(3-6): 144-282.

Seibel HR, Schweisthal MR. 1972. Relationship between the pineal gland, other endocrine glands and reproductive organs of single and parabiotic golden hamsters [J]. *Acta Endocrinol,* **74**(3): 434-448.

Touma C, Sachser N, Möstl E, Palme R. 2003. Effects of sex and time of day on metabolism and excretion of corticosterone in urine and feces of mice [J]. *Gen Comp Endocrinol,* **130**(3): 267-278.

UFAW. 2006. Quality of Life: The Heart of the Matter. London: UFAW/BVA Ethics Committee Symposium, 13-14.

Voigländer T, Unterberge U, Touma C, Palme R, Polster B, Strohschneider M, Dorner S, Budka H. 2006. Prominent corticosteroid disturbance in experimental prion disease [J]. *Eur J Neurosci,* **23**(10): 2723-2730.

动　物　学　研　究　2012，Oct. 33(5): 498−502　　CN 53-1040/Q　ISSN 0254-5853
Zoological Research　　DOI：10.3724/SP.J.1141.2012.05498

老化对猕猴中颞视区细胞早期方向选择性的影响

梁　振[1], 陈月明[1,*], 孟　雪[1], 王　奕[1], 周宝琢[2], 谢莹莹[1], 何文胜[1]

(1. 安徽医科大学 生命科学学院生物医学工程系，安徽 合肥　230032;
2. 中国科学技术大学 生命科学学院，安徽 合肥　230027)

摘要：中颞视区(middle temporal area、MT/V5)在视觉运动处理过程中起着重要作用。MT 区神经元对物体运动方向具有强选择性, 而这种细胞的方向选择性被认为是运动方向知觉的神经基础, 且已有实验表明方向选择性由于受到注意影响，而在时间进程上分为 2 个阶段。该研究组先前的实验发现麻醉猕猴 (*Rhesus macaque*) MT 区细胞的方向选择性发生了衰退, 但该衰退是整个时间进程上平均的结果, 并不能在时间进程上揭示其神经机制。因此, 为了进一步探索运动方向感知能力下降的神经机制, 该实验采用单细胞技术在麻醉猕猴的 MT 区研究了在正常老化过程中 MT 区细胞的早期方向选择性变化(early stage direction selectivity, esDB), 结果表明老年猕猴 MT 区细胞早期方向选择性显著降低, 具有强早期方向选择性的细胞显著减少。该结果进一步揭示了 MT 区细胞方向选择性在早期发生的衰退可能介导了视觉运动感知能力的下降。

关键词：早期方向选择性; 中颞视区; 老化
中图分类号：Q436; Q429+2; Q421; Q424　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**0254-5853-(2012)05-0498-05

Aging affects early stage direction selectivity of MT cells in rhesus monkeys

LIANG Zhen[1], CHEN Yue-Ming[1,*], MENG Xue[1], WANG Yi[1], ZHOU Bao-Zhuo[2], XIE Ying-Ying[1], HE Wen-Sheng[1]

(1. *Department of Bio-Medical Engineering*, *Anhui Medical University*, *Hefei Anhui*　230032, *China*; 2. *Vision Research Laboratory*, *School of Life Science*, *University of Science and Technology of China*, *Hefei Anhui*　230027, *China*)

Abstract: The middle temporal area (MT/V5) plays an important role in motion processing. Neurons in this area have a strongly selective response to the moving direction of objects and as such, the selectivity of MT neurons was proposed to be a neural mechanism for the perception of motion. Our previous studies have found degradation in direction selectivity of MT neurons in old monkeys, but this direction selectivity was calculated during the whole response time and the results were not able to uncover the mechanism of motion perception over a time course. Furthermore, experiments have found that direction selectivity was enhanced by attention at a later stage. Therefore, the response should be excluded in experiments with anesthesia. To further characterize the neural mechanism over a time course, we investigated the age-related changes of direction selectivity in the early stage by comparing the proportions of direction selective MT cells in old and young macaque monkeys using *in vivo* single-cell recording techniques. Our results show that the proportion of early-stage-direction-selective cells is lower in old monkeys than in young monkeys, and that the early stage direction bias (esDB) of old MT cells decreased relative to young MT cells. Furthermore, the proportion of MT cells having strong early stage direction selectivity in old monkeys was decreased. Accordingly, the functional degradation in the early stage of MT cells may mediate perceptual declines of old primates in visual motion tasks.

Key words: Early stage direction selectivity; Middle temporal area; Aging

精确感知物体运动方向的能力对于生存来说至关重要。近年来, 许多心理物理学实验表明该能力在人类的正常老化过程中发生了衰退(Habak & Faubert, 2000; Norman et al, 2003; Snowden &

收稿日期：2012-06-11；接受日期：2012-07-10
基金项目：国家自然科学基金面上项目(31171082); 安徽省高等学校省级自然科学研究项目(KJ2012A154)
*通信作者(Corresponding author)，E-mail: ahchen123@foxmail.com

Kavanagh, 2006; Tran et al, 1998; Trick & Silverman, 1991; Willis & Anderson, 2000; Wist et al, 2000), 但这种衰退不能完全由眼视光和视网膜的变化来解释(Ball & Sekuler, 1986)。因此, Spear 提出假说认为这种衰退来源于视觉中枢的功能性退化(Spear, 1993; Spear et al, 1994)。

在过去几年里, 已有不少研究使用单细胞记录技术来探讨方向知觉的衰老机制。对于 MT 区的研究表明, 老年猕猴 MT 区细胞的方向选择性和对比敏感度均出现衰退(Liang et al, 2010; Yang et al, 2009)。众所周知, 方向选择性细胞在运动处理过程中起着非常重要的作用, 同时 top-down 的注意在时间进程的晚期(视觉刺激 300 ms 之后)对方向选择性产生调制作用(Bergen & Julesz, 1983; Cavanagh et al, 1990; Martinez-Trujillo & Treue, 2004; Roelfsema et al, 2007; Treisman & Gelade, 1980)。在麻醉麻痹的单细胞记录过程中, top-down 的注意调制由于麻醉作用而大幅度削弱。为了进一步探索运动方向感知能力下降的神经机制, 有必要在时间进程的早期研究在正常老化过程中 MT 区细胞方向选择性的变化。

该实验通过比较 MT 区细胞的早期方向选择性, 研究了老化对猕猴 MT 区细胞功能的影响, 以进一步揭示 MT 区早期方向选择性在老化进程中的作用。

1　材料与方法

分别在 3 只青年(4～6 岁)和 4 只老年(23～31 岁)猕猴的 MT 区记录细胞反应。根据整个生命周期计算(Tigges et al, 1988), >4 岁的猕猴为发育成熟的成年猕猴, >20 岁的猕猴开始进入衰老阶段(猕猴年龄 20 岁=人类年龄 60 岁)。 实验前, 每只猴子均由专业医生进行眼科检查, 以确保猴子没有明显的眼视光和视网膜病变, 眼底血管、晶状体透明度和黄斑均正常。所有实验相关操作均得到了中国科学技术大学生命科学学院动物伦理审查委员会的许可, 操作过程参考了美国国立卫生研究院(NIH)实验动物饲养及使用指南的相关内容。采取的一切措施皆以减少实验动物的痛苦及使用数量为目标。

手术前, 使用盐酸氯胺酮(10 mg/kg)对猕猴进行引导麻醉, 继而用含有 3～5%异氟烷(Halothane)的氧化亚氮/医用氧混合气体(N_2O:O_2=70:30)维持麻醉状态。动物达到适当的麻醉深度后, 在无菌条件下, 进行静脉和气管插管手术。所有创口及压力点均施用长效局部麻醉药物(2%盐酸利多卡因软膏)。使用筒剑毒[d-tubocurarine, 0.4 mg/(kg·h)]和三典季胺芬[gallamine triethiodiede, 7 mg/(kg·h)]糖混合溶液(5%)诱导并通过静脉插管对其进行持续麻痹。N_2O(75%)和 O_2(25%)和异氟烷(0.25%～1%)的混合气持续供应维持麻醉。使用人工呼吸机, 调节潮气量使呼出的 CO_2 维持在～4%。使用电热毯等保温装置, 使动物体温维持在～38 ℃。整个实验过程中持续监视心率及脑电以衡量麻醉深度。

当将猕猴置于生命维持系统后, 调整麻醉深度使青、老年猕猴的生命体征维持一致, 用接触镜隔离保护眼睛。在整个实验过程中, 反复测量确定视盘和中央凹的位置, 猕猴的眼睛无明显病变。中颞视区定位在耳杆向后 2 mm, 旁开 15 mm, 初级视皮层定位在耳杆后 3 mm, 旁开 2 mm。以相应的点为圆心, 开一个直径为 4 mm 的洞, 去除硬脑膜暴露脑组织, 在电极进入脑组织后使用 4%琼脂凝胶(agar)覆盖颅骨开孔, 保护脑组织。 细胞外单细胞电信号通过玻璃微电极(内充 4 M NaCl)进行记录, 电极阻抗选择在 2～5 MΩ。中颞视区细胞的离心度主要分布于 2～40°, 初级视皮层细胞的离心度主要分布于 2～15°。电极使用液压式微推进器 (David Kopf Instruments, Tojunga, California) 推进。

由计算机产生的刺激图形显示于放置在实验动物眼球前 57 cm 处的 CRT 显示器(1024×768, 100 Hz, G220, SONY, Japan)。实验状态下显示器的平均亮度为 38.7 cd/m^2, 在实验动物角膜附近的环境光照强度～0.1 lux。实验所用生成刺激图形程序由基于 MATLAB^{TM}(Mathworks, Natick, MA, USA)的心理物理学工具包(Psychtoolbox)开发完成。CRT 显示器的亮度非线性通过软件自动矫正。

首先测量细胞的最优空间频率和时间频率, 在最优刺激大小、时间频率和空间频率下, 以运动的正弦光栅和格栅为刺激图形, 每个刺激小节(trial)时间(2.5 s)包含 5 个周期(cycle), 刺激图形的 Michaelson 对比度设置在 100%; 对于测试的每个方位随机呈现 2 个刺激小节(即每个方位共有 10 个周期的正弦光栅和格栅刺激); 在每两个刺激小节之间插入一个 4 s 的空白图形用于获取神经元的自发发放并避免刺激适应的产生, 呈现空白图形时显示器全屏呈现平均亮度; 对神经元的优势眼在其最优的刺激图形大小以及最优的空间频率下进行记录; 使用一组运动方向不同的刺激(共包括 24 个不

同的方向, 0～345°每 15°获取一个值)在神经元的最优刺激参数下对神经元的方位调谐曲线进行描绘, 每个刺激图形的方位与其运动方向垂直。

单个神经元放电通过细胞外单细胞放大器(DAGAN, USA)进行放大, 然后一路信号接入示波器, 另一路信号经过数据采集卡(National Instruments, USA)模数转换后存入计算机进行后续分析。实验数据采集及分析程序使用 Igor (WaveMetrics, USA)开发。

分析早期方向选择性时, 首先分析细胞对不同方向视觉刺激产生反应的刺激后 300 ms 内的直方图 (post-stimulus time histogram, PSTH, bin 宽取 10 ms); 叠加平均相同方向的 10 个刺激的刺激后时间直方图, 取其均值反应减去细胞自发发放值作为衡量细胞对该刺激反应幅度的指标; 描绘该细胞的方向调谐曲线并计算其早期方向选择性强度和最优方向。

早期方向选择性计算方法和我们先前计算方向选择性的方法相同(Liang et al, 2010), 现简述如下：将细胞在每个刺激方位下的反应值以矢量方式进行加和, 然后用加和后的矢量值除以矢量模的和即可得到矢量形式的方向选择性指数(Leventhal et al, 1995)。矢量形式的选择性指数方向即代表神经元的最优方向, 其模的大小(即方向选择性 esDB)表征细胞方向选择性的强弱。早期方向选择性指数 esDB 的取值范围为 0～1, esDB=0, 说明细胞完全不具有方向选择性; esDB=1 , 说明细胞只对一个方向的刺激产生反应; esDB>0.2 表示该细胞有统计显著意义的方向选择性强度(*P*<0.005, Rayleigh 检验)。

2 实验结果

分别在 3 只青年猕猴 MT 区记录到 84 个细胞, 4 只老年猕猴 MT 区记录到 98 个细胞, 并测量细胞对正弦光栅的反应, 且细胞的记录深度和离心度在青、老年猕猴中一致。

绝大部分 MT 区神经元具有强方向选择性, 且在视觉信息运动处理过程中起着至关重要的作用 (Albright, 1984; Britten et al, 1992; Movshon et al, 1986; Newsome & Pare, 1988)。图 1 为典型的青、老年猕猴 MT 区神经元对正弦光栅的反应。从极坐标图中可以看出老年猕猴的 MT 细胞调谐曲线显著性宽于青年猕猴, 即老年猕猴 MT 区细胞的方向选择性降低。

青、老年猕猴 MT 区细胞早期方向选择性的详细数据见表 1。按照方向选择性强度将细胞分为无选择性细胞(esDB<0.1), 强选择性细胞(esDB>0.2)和极强选择性细胞(esDB>0.4)。结果表明老年猕猴所具有的强选择性细胞(39.8%, 39/98)相对青年猕

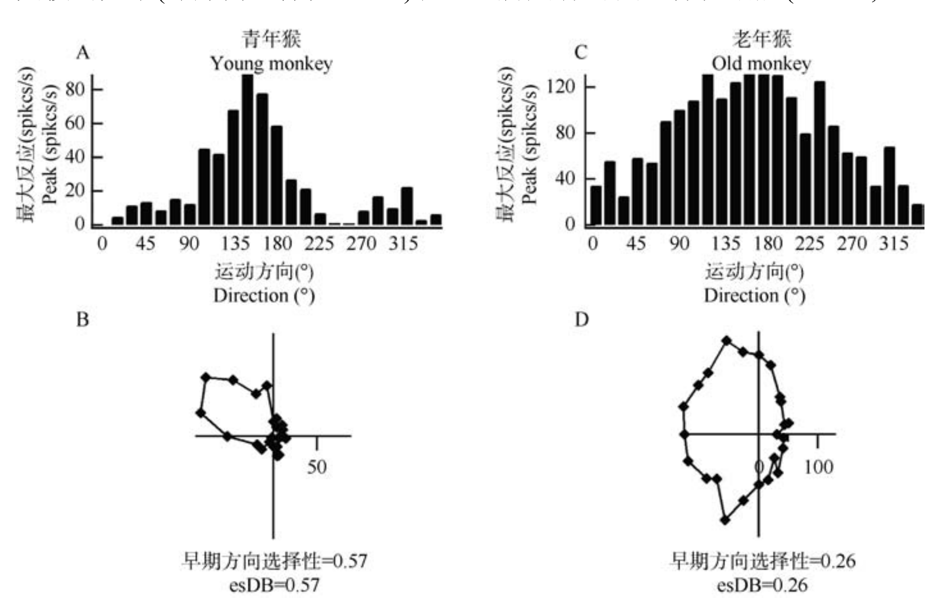


图 1 典型的青年猕猴和老年猕猴 MT 区神经元对正弦光栅的反应

Fig. 1 Tuning curves and corresponding polar plots obtained from young and old monkeys

A, B)青年猕猴; C, D)老年猕猴。极坐标图上的点指示正弦光栅的运动方向, 正弦光栅运动方向取自 360°范围内等间隔(15°)的 24 个方向, 且与正弦光栅的方位垂直, 不同的运动方向随机呈现, 每个方向重复运动 10 次。

A, B) young monkeys; C, D) old monkeys. The stimuli were drifting sinusoidal gratings, randomly varied in 24 directions which ranged from 0° to 360° in 15° steps. Each stimulus was presented in 10 cycles. Each point in the polar graph represents the response to the stimulus moving in the indicated direction.

表 1　强选择性细胞和极强选择性细胞在青老年 MT 区所占的比例

Tab. 1　Descriptive statistics of the proportions of MT cells between young and old groups

	强选择性 Strong directional bias (esDB>0.2)	极强选择性 Very strong directional bias (esDB>0.4)
Young	72/84 (85.7%)	43/84 (51.2%)
Old	39/98 (39.8%)	10/98 (10.2%)
chi-square test P value	P≤0.001	P≤0.001

使用列联表和卡方检验强选择性细胞和极强选择性细胞在青、老年 MT 区所占的比例，强选择性细胞和极强选择性细胞所占的比例均显著减少(chi-square test, *P*≤0.01)。

The age-related changes in proportions of non-direction-biased cells (esDB<0.1), strong-direction-biased cells (esDB>0.4) and very-strong-direction-biased cells (esDB>0.4) were examined by using contingency tables. The proportions of strong-direction-biased and very-strong-direction-biased MT cells were decreased in old monkeys compared to those in young monkey groups.

猴(85.7%; 72/84; chi-square test, *P*≤0.001)显著降低，而极强选择性细胞受老化的影响最为严重，从青年猕猴的 51.2%(43/84)下降到老年猕猴的 10.2% (10/98; χ2 test, *P*≤0.001)。

在该实验中，我们还分析了 esDB 的分布(图 2)，84 个青年猕猴 MT 区细胞和 98 个老年猕猴 MT 区细胞均参与了数据分析。老年猕猴 MT 区细胞的方向选择性曲线左移，表明老年猕猴 MT 区细胞的选择性(mean±*SD*, 0.18±0.12, *n*=98)相比青年猕猴 MT 区细胞 (mean±*SD*：0.39±0.13; *n*=84)显著降低(*t*-test, *P*≤0.001)。

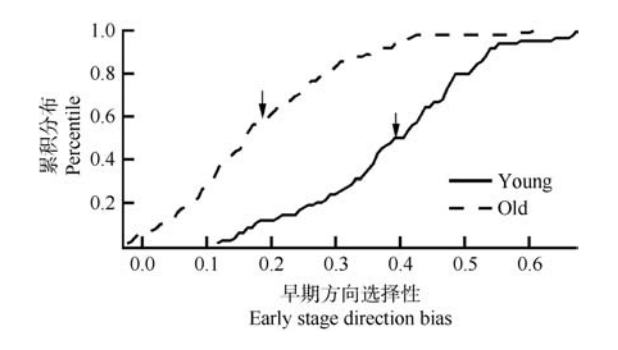


图 2　早期方向选择性的累积分布图

Fig. 2　Cumulative distribution of esDB in young and old monkey MT cells

青年猕猴 MT 区细胞共 84 个，老年猕猴 MT 区细胞共 98 个；实线和虚线分别表示青年和老年猕猴 MT 区细胞的累积分布曲线；箭头指向均值所在的位置。

The percentage of young (*n*=84) and old (*n*=98) monkey MT cells with any given esDB is shown in cumulative distribution plots. Solid and dashed lines represent the data for young and old monkeys, respectively. The arrow on the line indicates the mean value. Old monkey cells showed decreased esDB values in comparison with young monkey cells.

3　讨　论

本实验研究了老化对 MT 区早期方向选择性的影响，结果表明与青年猕猴相比，老年猕猴的 MT 区细胞早期方向选择性显著降低。提示功能性衰退发生在 MT 区，且这种功能性衰退可能导致了正常老化过程中视运动知觉的衰退。

众所周知，方向选择性细胞在运动处理过程中起着非常重要的作用，同时 top-down 的注意在时间进程的晚期对方向选择性产生调制作用(Bergen & Julesz, 1983; Cavanagh et al, 1990; Martinez-Trujillo & Treue, 2004; Roelfsema et al, 2007; Treisman & Gelade, 1980)。Liang et al (2010)发现老年猕猴 MT 区细胞方向选择性显著降低，但这个衰退是整个时间进程的平均结果，并不能在时间进程上揭示其神经机制以及老化在 down-top 和 top-down 过程中对方向选择性的影响。本实验采用急性电生理方法，在猕猴麻醉麻痹的状态下记录细胞反应。Top-down 的注意调制由于麻醉作用而大幅度削弱，而 down-top 的方向选择性得到保留。因此，在本实验中我们选择在时间进程的早期研究在正常老化过程中 MT 区细胞方向选择性的变化，以揭示老化对上行方向选择性的影响。该结果和我们先前的研究结果一致。

目前，我们发现与年龄相关的功能衰退可能是由细胞次级结构的改变所导致的。因为先前的大量实验表明猕猴和人类大脑皮层的细胞未发生丢失(Morrison & Hof, 1997, 2007; Peters et al, 1996, 1998; Wong, 2002; Yu et al, 2006)，特别是在 Superior Temporal Sulcus (STS) 区的实验亦未发现年龄相关的细胞丢失(Duan et al, 2003; Morrison & Hof, 2007)。MT 区位于 STS 区的后岸，同时向前额叶 46 区有大量投射，且 MT 区的神经元可以由在前额叶 46 区逆行染色而着色。前额叶 46 区逆行染色的神经元树突棘的数量和密度显著降低将导致突触的减少，而突触是神经元功能的最小单位。因此，这种突触前、后的异常可能是导致 MT 区细胞功能性衰退的原因。

神经化学递质的改变也可能导致老年视皮层的衰退。我们的结果表明老年猕猴 MT 区细胞具有高自发发放和诱发发放、低信噪比以及低方向选择

性，表明皮层内的抑制回路可能发生了衰退。Schmolesky *et al* (2000) 认为抑制回路的衰退可以解释他们所发现的过度活动现象以及其他年龄相关变化。而且，有实验发现在初级视皮层施加GABA 及其激动剂可以抑制皮层细胞的过度活动，并提高初级视皮层细胞的功能(Leventhal et al, 2003)。近年来的心理物理学工作也表明老年人皮层抑制功能降低(Betts et al, 2005; Butler & Zacks, 2006)。另外, GABA 能中间神经元在 MT 区的广泛分布(Thiele et al, 2004)也已被证明。综上所述, MT 区细胞功能的衰退很可能由 GABA 能抑制系统的退化所导致的。

老年人在运动敏感性和运动识别、鉴别上表现衰退(Habak & Faubert, 2000; Tran et al, 1998; Trick & Silverman, 1991; Willis & Anderson, 2000), 而这些运动知觉相关的功能依赖于大脑中的方向选择性细胞。我们发现的老年猕猴 MT 区细胞功能的衰退可能导致了运动知觉的衰退, 即 MT 区细胞的功能衰退可能是导致老年灵长类运动知觉退化的原因之一。

参考文献：

Albright TD. 1984. Direction and orientation selectivity of neurons in visual area MT of the macaque [J]. *J Neurophysiol,* **52**(6): 1106-1130.

Ball K, Sekuler R. 1986. Improving visual perception in older observers [J]. *J Gerontol,* **41**(2): 176-182.

Bergen JR, Julesz B. 1983. Parallel versus serial processing in rapid pattern discrimination [J]. *Nature,* **303**(5919): 696-698.

Betts LR, Taylor CP, Sekuler AB, Bennett PJ. 2005. Aging reduces center-surround antagonism in visual motion processing [J]. *Neuron,* **45**(3): 361-366.

Britten KH, Shadlen MN, Newsome WT, Movshon JA. 1992. The analysis of visual motion: a comparison of neuronal and psychophysical performance [J]. *J Neurosci,* **12**(12): 4745-4765.

Butler KM, Zacks RT. 2006. Age deficits in the control of prepotent responses: evidence for an inhibitory decline [J]. *Psychol Aging,* **21**(3): 638-643.

Cavanagh P, Arguin M, Treisman A. 1990. Effect of surface medium on visual search for orientation and size features [J]. *J Exp Psychol Hum Percept Perform,* **16**(3): 479-491.

Duan H, Wearne SL, Rocher AB, Macedo A, Morrison JH, Hof PR. 2003. Age-related dendritic and spine changes in corticocortically projecting neurons in macaque monkeys [J]. *Cereb Cortex,* **13**(9): 950-961.

Habak C, Faubert J. 2000. Larger effect of aging on the perception of higher-order stimuli [J]. *Vision Res,* **40**(8): 943-950.

Leventhal AG, Thompson KG, Liu D, Zhou Y, Ault SJ. 1995. Concomitant sensitivity to orientation, direction, and color of cells in layers 2, 3, and 4 of monkey striate cortex [J]. *J Neurosci,* **15**(3 Pt 1): 1808-1818.

Leventhal AG, Wang YC, Pu ML, Zhou YF, Ma YY. 2003. GABA and its agonists improved visual cortical function in senescent monkeys [J]. *Science,* **300**(5620): 812-815.

Liang Z, Yang Y, Li GX, Zhang J, Wang YC, Zhou YF, Leventhal AG. 2010. Aging affects the direction selectivity of MT cells in rhesus monkeys [J]. *Neurobiol Aging,* **31**(5): 863-873.

Martinez-Trujillo JC, Treue S. 2004. Feature-based attention increases the selectivity of population responses in primate visual cortex [J]. *Curr Biol,* **14**(9): 744-751.

Morrison JH, Hof PR. 1997. Life and death of neurons in the aging brain [J]. *Science,* **278**(5337): 412-419.

Morrison JH, Hof PR. 2007. Life and death of neurons in the aging cerebral cortex [J]. *Int Rev Neurobiol,* **81**: 41-57.

Movshon JA, Adelson EH, Gizzi MS, Newsome WT. 1986. The analysis of moving visual patterns [J]. *Exp Brain Res,* **54**(Suppl 2): 117-151.

Newsome WT, Pare EB. 1988. A selective impairment of motion perception following lesions of the middle temporal visual area (MT) [J]. *J Neurosci,* **8**(6): 2201-2211.

Norman J F, Ross HE, Hawkes LM, Long JR. 2003. Aging and the perception of speed [J]. *Perception,* **32**(1): 85-96.

Peters A, Morrison JH, Rosene DL, Hyman BT. 1998. Feature article: are neurons lost from the primate cerebral cortex during normal aging? [J]. *Cereb Cortex,* **8**(4): 295-300.

Peters A, Rosene DL, Moss MB, Kemper TL, Abraham CR, Tigges J, Albert MS. 1996. Neurobiological bases of age-related cognitive decline in the rhesus monkey [J]. *J Neuropathol Exp Neurol,* **55**(8): 861-874.

Roelfsema PR, Tolboom M, Khayat PS. 2007. Different processing phases for features, figures, and selective attention in the primary visual cortex [J]. *Neuron,* **56**(5): 785-792.

Schmolesky MT, Wang Y, Pu M, Leventhal AG., 2000. Degradation of stimulus selectivity of visual cortical cells in senescent rhesus monkeys [J]. *Nat Neurosci*, 3, 384–390.

Snowden RJ, Kavanagh E. 2006. Motion perception in the ageing visual system: minimum motion, motion coherence, and speed discrimination thresholds [J]. *Perception,* **35**(1): 9-24.

Spear PD. 1993. Neural bases of visual deficits during aging [J]. *Vision Res,* **33**(18): 2589-2609.

Spear PD, Moore RJ, Kim CB, Xue JT, Tumosa N. 1994. Effects of aging on the primate visual system: spatial and temporal processing by lateral geniculate neurons in young adult and old rhesus monkeys [J]. *J Neurophysiol,* **72**(1): 402-420.

Thiele A, Distler C, Korbmacher H, Hoffmann KP. 2004. Contribution of inhibitory mechanisms to direction selectivity and response normalization in macaque middle temporal area [J]. *Proc Natl Acad Sci USA,* **101**(26): 9810-9815.

Tigges J, Gordon TP, McClure HM, Hall EC, Peters A. 1988. Survival rate and life span of rhesus monkeys at the Yerkes regional primate research center [J]. *Am J Primatol,* **15**(3): 263-273.

Tran DB, Silverman SE, Zimmerman K, Feldon SE. 1998. Age-related deterioration of motion perception and detection [J]. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol,* **236**(4): 269-273.

Treisman AM, Gelade G. 1980. A feature-integration theory of attention [J]. *Cogn Psychol,* **12**(1): 97-136.

Trick GL, Silverman SE. 1991. Visual sensitivity to motion: age-related changes and deficits in senile dementia of the Alzheimer type [J]. *Neurology,* **41**(9): 1437-1440.

Willis A, Anderson SJ. 2000. Effects of glaucoma and aging on photopic and scotopic motion perception [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci,* **41**(1): 325-335.

Wist ER, Schrauf M, Ehrenstein WH. 2000. Dynamic vision based on motion-contrast: changes with age in adults [J]. *Exp Brain Res,* **134**(3): 295-300.

Wong TP. 2002. Aging of the cerebral cortex [J]. *McGill J Med,* **6**: 104-113.

Yang Y, Zhang J, Liang Z, Li GX, Wang YC, Ma YY, Zhou YF, Leventhal AG. 2009. Aging affects the neural representation of speed in Macaque area MT [J]. *Cereb Cortex,* **19**(9): 1957-1967.

Yu S, Wang Y, Li X, Zhou Y, Leventhal AG. 2006. Functional degradation of extrastriate visual cortex in senescent rhesus monkeys [J]. *Neuroscience,* **140**(3): 1023-1029.

动 物 学 研 究 2012，Oct. 33(5): 503−509 CN 53-1040/Q ISSN 0254-5853
Zoological Research DOI：10.3724/SP.J.1141.2012.05503

三种创伤弧菌免疫原的制备及其对黄姑鱼的免疫保护效果

闫茂仓, 单乐州, 陈少波*, 谢起浪

(浙江省海洋水产养殖研究所 浙江省近岸水域生物资源开发与保护重点实验室, 浙江 温州 325006)

摘要：从创伤弧菌(*Vibrio vulnificus*)中提取菌体脂多糖(lipopolysaccaride, LPS)和外膜蛋白(outer membrane protein, OMP)并制备福尔马林灭活全菌苗(FKC), 腹腔注射接种黄姑鱼。分别在注射第 0、7、14、21 和 28 天后测定了受免鱼血清中凝集抗体效价、血清溶菌酶活性和血液白细胞吞噬活性, 以及免疫 28 d 后的相对免疫保护率。结果表明, 3 种抗原对黄姑鱼均有较强的免疫原性。免疫后, 免疫组血清凝集抗体效价逐渐增高, 第 28 天时最高; 溶菌酶活性(LMZ)、白细胞吞噬活性(PP)和吞噬指数(PI)显著升高($P<0.01$), 第 21 天达到峰值, 随后逐渐下降。各组之间比较表明, 受免后 7、14、21 和 28 d, 免疫组黄姑鱼凝集抗体效价、PP、PI 和 LMZ 显著高于对照组($P<0.05$), LPS 和 OMP 组凝集抗体效价低于 FKC 组, LPS 和 OMP 组的相对免疫保护率高于 FKC 组, 各组间免疫保护率大小顺序为 LPS 组>OMP 组>FKC 组>对照组。

关键词：黄姑鱼; 创伤弧菌; 保护性抗原; 免疫机能
中图分类号：Q959.483; S942 **文献标志码**：A **文章编号**：0254-5853-(2012)05-0503-07

Effects of three antigens extracted from *Vibrio vulnificus* on the immunological protection of *Nibea albiflora*

YAN Mao-Cang, SHAN Le-Zhou, CHEN Shao-Bo*, XIE Qi-Lang

(*Zhejiang Mariculture Research Institute*, *Zhejiang Key Laboratory of Exploitation and Preservation of Coastal Bio-resource*, *Wenzhou* 325005, *China*)

Abstract: *Nibea albiflora* was immunized by intraperitoneal injection with either Lipopolysaccharide (LPS) or outer membrane protein (OMP) extracted from *Vibrio vulnificus* or formalin killed *Vibrio vulnificus* (FKC). The influence of the three antigens on the immunological function of *Nibea albiflora* was determined at different time points following the injection by testing the agglutinating antibody titers of the serum, lysozyme activity of the serum, phagocytic activity of the blood and the relative survival percentage. The results showed that the three antigens have higher immunogenicity and antigenicity than the control group(injection with sterile saline). The agglutinating antibody titers of the immune challenged groups increased quickly, and were highest on the day 28. The lysozyme activity and phagocytic activity were raised significantly ($P<0.01$), reaching their top value on day 21, and then the index gradually reduced. The immunological indexes of three immune groups were higher than the control group ($P<0.05$). The agglutinating antibody titers of the LPS group or the OMP group were lower than the control group, but the relative survival percentage was adverse when challenged with a *Vibrio vulnificus* infection. The order of relative survival percentage was group LPS>OMP>FKC>Control.

Key words: *Nibea albiflora*; *Vibrio vulnificus*; protective antigens; immunological function

黄姑鱼(*Nibea albiflora*)属石首鱼科(Sciaenidae)黄姑鱼属(*Nibea*), 为近海暖温性中下层经济鱼类, 分布于中国、朝鲜半岛和日本南部沿海, 是我国重要的经济鱼类。随着养殖密度的增大和养殖生态环境的恶化, 黄姑鱼的病害日趋严重, 主要发生在鱼苗鱼种阶段(Ma et al, 2008)。创伤弧菌(*Vibrio vulnificus*)作为一种重要的致病性弧菌, 广泛分布在沿海地区, 感染黄姑鱼(Ma et al, 2008)、卵形鲳鲹(*Trachinotus ovatus*)(Zhao et al, 2007)、大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)(Yu et al, 2008)、石鲽(*Kareius*

收稿日期：2012-03-05；接受日期：2012-08-27
基金项目：浙江省科技计划项目(2006R20001); 温州市科技计划项目(S20070051); 浙江省科技计划项目(2007F10009); 温州市重点科技创新团队建设项目(C20120004); 浙江省科技计划项目(2009C12081); 浙江省科技厅创新团队建设与人才培养项目(2011F20032)
*通信作者(Corresponding author)，E-mail: chenshaobo@hotmail.com
第一作者简介：闫茂仓, 男, 助理研究员, 研究方向为水产免疫学；E-mail：yanmaocang@126.com

bicoloratus)(Shen et al, 2001)、鳗鲡(*Anguilla anguilla*)(Xu et al, 2005)和军曹鱼(*Rachycentron canadum*)(Jian et al, 2003)等鱼类。

目前, 国内外学者大量报道了弧菌等致病菌灭活疫苗对水产养殖动物免疫应答方面的研究(Kawai & Kusuda, 1995; Ma et al, 2010)。然而, 灭活疫苗中包含诸多无效抗原, 所产生的抗体并不是全部具有保护性。脂多糖(lipopolysaccaride, LPS)和外膜蛋白(outer membrane protein, OMP)都是病原菌的菌体成分, 是主要保护性抗原(Yan, 2005)。许多研究结果表明, 脂多糖(lipopolysaccaride, LPS)和外膜蛋白(outer membrane protein, OMP)皆具有较强的免疫原性, 可以提高机体的非特异性免疫功能(Dalmo et al, 2000; Huang & Lu, 2002; Bader et al, 2004; Yan, 2005); LPS 能刺激 B 淋巴细胞产生特异性抗体, 引起机体的免疫反应; OMP 可激发机体的体液免疫和细胞免疫, 并且可通过遗传工程大量表达(Bøgwald et al, 1992; Solem et al, 1995; Rahman & Kawai, 2000; Mo et al, 2002)。近年来, 研究工作者对弧菌全菌灭活疫苗免疫原性做了大量的研究工作, 但是关于弧菌菌体成分亚单位疫苗(OMP 和 LPS 等)提升海水养殖鱼类免疫机能的报道却比较少。本研究通过测定血清中凝集抗体效价、血清溶菌酶活性、血液白细胞吞噬活性以及相对免疫保护率来探讨创伤弧菌 LPS 和 OMP 对黄姑鱼免疫机能的影响, 旨在掌握 LPS 和 OMP 的免疫学特性, 为丰富海水鱼类弧菌疾病的免疫防治提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试鱼 浙江省海洋水产养殖研究所自繁养殖黄姑鱼, 120 日龄, 体重(50±10) g; 选择规格一致、外观健壮、游动活泼、无外伤的鱼作为试验鱼。试验鱼暂养于 3.3 m×3.3 m×1.0 m 的室内水泥池中, 充气, 以配合饵料(福州海马饲料有限公司)每日早、晚各投饵 1 次, 每天上午换水, 流水 1 h, 水温控制在 27.8~31.2 ℃。暂养 1 周后, 进行免疫接种。

1.1.2 试验菌株 供试菌株为从乐清湾养殖黄姑鱼分离的创伤弧菌(*Vibrio vulnificus*)强毒株(Ma et al, 2008; Yan et al, 2010)。

1.2 免疫原的制备

1.2.1 全菌苗 FKC 的制备 将菌株接种于 ZOBELL 2216E 斜面, 28 ℃培养 24 h 后, 以无菌生理盐水洗下, 调节成 $1.0×10^9$ cells/mL 的浓度, 加入终浓度为 0.5%的福尔马林, 28 ℃灭活 24 h 后, 以平板培养法检查灭活效果, 确认彻底灭活后, 保存在 4 ℃冰箱中备用。

1.2.2 创伤弧菌 LPS 的制备 按 Westphal & Jann(1969)酚水法进行, 取 20 mL 蒸馏水与 20 mL 浓度为 $1.0×10^9$ cells/mL 的创伤弧菌配制成菌悬液, 于 65 ℃下加入等量的 90%苯酚振荡 10 min, 冷却至 15 ℃后, 10 000 r/min 离心 30 min, 取出上清液装入透析袋, 4 ℃蒸馏水透析 3 d, 30 000 r/min, 10 ℃条件下离心 5 h, 取上清液冷冻干燥得到 LPS 粉末, 置 4 ℃冰箱备用。临用前, 加入 10 mL 无菌水, 蒽酮法测定多糖含量为 0.428 mg/mL, 65 ℃水浴中作用 30 min 去除毒性, 用无菌生理盐水调浓度至 0.2 mg/mL。

1.2.3 创伤弧菌 OMP 的制备 参照 Sarkosyl 法(Lutwyche et al, 1995)提取 OMP 的方法, 取 50 mL 浓度为 $1.0×10^9$ cells/mL 的创伤弧菌菌悬液, 离心收集菌体, 用 20 mmol/L 的 Tris-HCl 缓冲液洗涤 3 次; 置冰浴下超声波破碎 10 min; 4 ℃, 6 000 r/min 离心 30 min, 收集上清液; 4 ℃, 50 000 r/min 离心 1 h; 弃上清, 沉淀溶解于 0.5%十二烷基肌氨酸(Sarkosyl)的 Tris-HCl 缓冲液中, 28 ℃作用 30 min; 4 ℃, 50 000 r/min 离心 1 h; 弃上清液, 用 20 mmol/L 的 Tris-HCl 缓冲液洗涤沉淀; 沉淀溶解于 10 mL 无菌重蒸水, Lowry 法测定蛋白含量为 0.494 mg/mL, −20℃保存。临用时以无菌生理盐水稀释至 0.1 mg/mL 备用。

1.3 吞噬原的制备

将金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)菌株接种在液体培养内, 在 37 ℃条件下培养 24 h 后, 离心集菌, 制备菌悬液。然后在 *S. aureus* 悬液中加入终浓度为 0.5%的福尔马林, 在 37 ℃条件下灭活 24 h。经过平皿法证实此菌已被彻底灭活后, 用无菌生理盐水清洗 3 次, 并将其浓度调节至 $1.0×10^8$ cells/mL, 即为福尔马林灭活的 *S. aureus* 菌体(formalin killed *S.aureus*, F-SA), 作为检测白细胞吞噬活性的吞噬菌体。置 4 ℃冰箱中保存备用。

1.4 免疫与采血

试验在 2.0 m×1.0 m×1.0 m 玻璃缸中进行, 试验共设 OMP、LPS 和 FKC 三个注射免疫处理组和无菌生理盐水注射对照组。以腹腔注射法进行, 每

尾鱼接种0.1 mL上述各种抗原, 即LPS的接种量为每尾鱼0.02 mg, OMP接种量为0.01 mg, FKC接种量为每尾鱼 $1.0×10^8$ 个细胞, 对照组注射相同剂量的灭菌生理盐水, 每组鱼注射 50 尾。实验前和免疫注射第 7 d、14 d、21 d 和 28 d 后, 分别从每组中随机捞取 5 尾鱼尾静脉采血, 每尾鱼的血液分为 2 份, 1 份以常法收集后, 制备血清, 供检测血清凝集抗体效价和溶菌酶活性用; 另 1 份用经肝素处理的离心管收集, 制备抗凝血, 供测定血液白细胞吞噬活性用。

1.5 凝集抗体效价的测定

采用血凝板法进行, 反应抗原为培养 24 h 后收集的菌液并经终浓度 0.5%福尔马林灭活的创伤弧菌($1.0×10^8$ cells/mL)。

1.6 溶菌酶活性的测定

参照 Zhao(2005)的方法, 以溶壁微球菌(*Micrococcus lysoleikticus*)冻干粉为底物, 用 1/15 mol/L, pH 6.4 磷酸缓冲液配成一定浓度的悬浊液(OD_{570}≈0.3)。取鱼血清 0.1 mL, 置 28 ℃水浴锅中预热 5 min, 然后加入 1.8 mL 已预热的菌液, 立即计时, 至 2 min 时加入 1 滴 5 mol/L KOH 溶液以终止反应, 立即于 640 nm 波长测其透光率 T1%。取鱼血清 0.1 mL, 加入 1 滴 5 mol/L KOH 溶液摇匀, 28 ℃水浴锅中预热 5 min 后加入 1.8 mL 已预热的菌液, 在同样温度下至 2 min 时同法测定其透光率 T0%, △T＝(T1%~T0%)为透光率的差值, 即溶菌酶透光率的变化。

准确称取溶菌酶标准品(Amresco 公司产品, 活性为 20 000 U/mg), 用 pH6.4, 1/15 mol/L PBS 配置成 1 000 μg/mL, 置冰箱保存。临用时再用 PBS 稀释成 500 μg/mL、100 μg/mL、50 μg/mL、25 μg/mL、10 μg/mL 标准液。用 0.1 mL 各种浓度的溶菌酶标准液代替血清样品, 操作方法与以上血清的相同。通过测得的不同浓度标准液透光率的变化值进行回归分析, 得到回归方程：U=a＋b△T。按上式计算血清样品溶菌酶的活性, 其中 U 表示溶菌酶活性(单位：U /mL)。

1.7 白细胞吞噬活性的测定

白细胞吞噬活性的测定参照 Luo et al(2001)的方法。取 100 μL 抗凝血, 加入 100 μL 的金黄色葡萄球菌菌液, 摇匀, 25 ℃水浴 60 min, 水浴期间每隔 10 min 摇动 1 次。用吸管吸取混合液涂片（每个血样涂 5 片）, 用甲醇固定 10 min, Giemsa 染色 1~1.5 h, 水洗风干后油镜观察。按下式计算吞噬百分比 (phagocytic percentage, PP) 和吞噬指数 (phagocytic index, PI)。吞噬百分比(PP)=参与吞噬的白细胞数/计数的白细胞总数×100%, 吞噬指数(PI)=吞噬细胞内的细菌总数/参与吞噬的细胞数。

1.8 攻毒试验

采用 Reed & Muench(1938)的方法测定创伤弧菌对黄姑鱼的 LD_{50} 为 $5.5×10^5$ CFU/鱼。于免疫接种后的第 28 d, 从免疫组和对照组各取 30 尾黄姑鱼, 每组各设 3 个平行组, 每个平行组 10 尾鱼, 每尾鱼腹腔注射 0.1 mL 浓度为 $5.5×10^6$ CFU/mL 创伤弧菌(*Vibrio vulnificus*)活菌液, 置于二级沙滤水饲养, 连续观察 14 d, 记录死亡状况, 并进行解剖和病原的再分离以确定是否死于攻毒活菌引起的感染。实验结束后计算相对免疫保护率(Relative percentage of survival, RPS)。RPS(%)＝1-(免疫组死亡率/对照组死亡率)×100%。

1.9 数据处理

采用 STATISTICA 7.0 统计软件作单因素方差分析处理, 组间差异采用 Duncan's 多重比较, 显著水平为 0.05, 极显著水平为 0.01。

2 结 果

2.1 三种免疫原对黄姑鱼凝集抗体效价的影响

受免和对照组黄姑鱼血清凝集抗体效价的测定结果如表 1 所示。可以看出, 三种抗原注射黄姑

表 1 黄姑鱼接种不同创伤弧菌抗原后的血清凝集抗体效价

Tab. 1 Serum antibody titers in *Nibea albiflora* inoculated with different *Vibrio vulnificus* antigens

免疫原 Immunogen	免疫后时间及其凝集效价 Days after immunization and titers/d				
	0	7	14	21	28
LPS	1:2~8 (1:4.2)	1:4~16 (1:10.4)	1:1~32 (1:21.1)	1:16~128 (1:48.4)	1:128~1024 (1:128)
OMP	1:2~4 (1:2.6)	1:4~16 (1:10.4)	1:8~32 (1:16)	1:8~64 (1:36.8)	1:32~512 (1:111.6)
FKC	1:2~8 (1:3.4)	1:8~256 (1:32)	1:8~512 (1:48.5)	1:32~1024 (1:168)	1:128~1024 (1:388)
Control	1:2~8 (1:3.8)	1:2~8 (1:3.4)	1:4~8 (1:4.6)	1:2~8 (1:3.2)	1:2~16 (1:4.8)

血清凝集效价以黄姑鱼血清的稀释倍数表示。括号内为几何平均数。

Serum antibody titers showed as dilution ratio of serum. Figures in parenthesis indicate geometric average value.

鱼 7 d 后, 血清凝集抗体效价均迅速上升。而对照组的血清凝集抗体效价一直都很低。免疫组血清凝集抗体效价高于对照组水平。接种 14 d、21 d 和 28 d 后各免疫组之间血清凝集抗体效价也有差异, FKC 组血清凝集抗体效价高于 LPS 和 OMP 组水平。

2.2 三种免疫原对黄姑鱼溶菌酶活性的影响

三种免疫原接种黄姑鱼后的溶菌酶变化见图 1。28 d 的实验期内, 对照组血清溶菌酶的活性为 578.4~612.8 U/mL, 无显著差异(P>0.05); 接种 7 d、14 d、21 d 和 28 d 后, 免疫鱼血清溶菌酶活性均显著地高于对照组(P<0.05), 第 21 d 时, 溶菌酶活性达到峰值, LPS 组最高(1 824.6 U/mL), 随后逐渐下降。LPS 组在所有免疫组中最高, OMP 组次之, 两者显著高于 FKC 组。

2.3 三种免疫原对黄姑鱼对吞噬活性的影响

受免和对照黄姑鱼血液中吞噬细胞对 F-SA 的吞噬活性的测定结果见表 2 所示。抗原 LPS、OMP 和 FKC 接种黄姑鱼后, 受免鱼血液中吞噬细胞的吞噬百分比(PP)和吞噬指数(PI)逐渐上升(P<0.05), 并在接种 21 d 左右达到峰值, 随后逐渐下降。在 14 d、21 d 和 28 d 时, 各免疫组的 PP 和 PI 值均极显著地高于对照组(P<0.01)。保护性抗原 LPS 和 OMP 没有显著的差异, 两者略高于 FKC 免疫组。

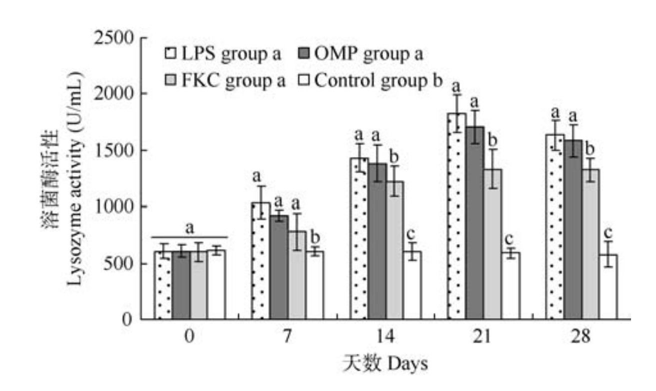


图 1 三种创伤弧菌抗原对黄姑鱼血清中溶菌酶活性的影响

Fig. 1 The effects of three *Vibrio vulnificus* antigens on serum lysozyme activity in *Nibea albiflora*

同一采样时间, 不同字母表示组间差异显著(P<0.05), 相同字母表示组间差异不显著(P>0.05)。

Different letters indicate significant differences (P<0.05), same letters indicate no significant differences (P>0.05) in the same observed period.

表 2 黄姑鱼接种不同创伤弧菌抗原后血液中白细胞吞噬活性的变化(平均值±标准差)

Tab. 2 The change of phagocytic activity in *Nibea albiflora* blood after inoculation with different *Vibrio vulnificus* antigens of (mean ±*SD*)

项目 Items	免疫组别 Immunized group	免疫后时间及其吞噬活性 Days after immunization and phagocytic activity （d）				
		0	7	14	21	28
PP(%)	LPS[a]	27.8±4.35	31.8±4.31[a]	36.4±7.45[a]	38.8±6.31[a]	34.6±5.85[a]
	OMP[a]	28.4±3.61	31.4±3.77[a]	36.8±6.55[a]	37.0±4.56[a]	35.4±5.54[a]
	FKC[a]	27.2±3.97	29.6±3.98[b]	33.8±3.760[a]	35.0±3.52[a]	35.2±3.54[a]
	Control[b]	27.8±4.12	27.8±4.31[b]	28.0±4.90[b]	28.2±5.08[b]	28.8±3.66[b]
PI(ind./cell)	LPS[a]	2.56±0.34	3.56±0.37[a]	4.62±0.57[a]	5.53±0.51[a]	5.19±0.65[a]
	OMP[a]	2.69±0.68	3.65±0.41[a]	4.65±0.45[a]	5.47±0.73[a]	5.16±0.39[a]
	FKC[a]	2.38±0.43	3.28±0.43[a]	4.59±0.48[a]	4.95±0.43[a]	4.75±0.52[a]
	Control[b]	2.48±0.43	2.31±0.40[b]	2.28±0.39[b]	2.27±0.58[b]	2.39±0.27[b]

PP: 吞噬百分比, 即吞噬细菌的白细胞占计数细胞的百分比; PI：吞噬指数, 即每个吞噬细胞吞噬的细菌个数。同一采样时间, 不同字母表示组间差异显著(P<0.05), 相同字母表示组间差异不显著(P>0.05)。

PP: Percentage of phagocytes; PI: Phagocytic index. Different letters indicate significant differences (P<0.05), same letters indicate no significant differences (P>0.05) in the same observed period.

2.4 相对免疫保护率的测定

LPS、OMP 和 FKC 对黄姑鱼的免疫保护效果见表 4, 结果表明, 菌体 LPS 和 OMP 免疫组对黄姑鱼有较高的免疫保护作用, 免疫保护率分别达到 77.8%和 66.7%, 全菌苗组低于 LPS 和 OMP 两组, 免疫保护率只有 44.4%。

3 讨 论

OMP 和 LPS 作为革兰氏阴性菌的主要保护性抗原, 具有良好的免疫原性, 国外内学者对其免疫原性以及亚单位疫苗的开发也做了大量的研究工作(Kawai et al, 2004; Ye et al, 2004; Maji et al, 2006;

表 3　三种创伤弧菌抗原对黄姑鱼的免疫保护效果

Tab. 3　The protective effect of the three antigens against a challenge with *Vibrio vulnificus*

组别 Group	攻毒鱼尾数 Number of challenged fish	死亡鱼尾数 Number of dead fish	死亡率/% Mortality/%	相对免疫保护率/% Relative percent survival/ %
LPS[a]	30	6	20	77.8[a]
OMP[ab]	30	9	30	66.7[ab]
FKC[b]	30	15	50	44.4[b]
Control[c]	30	27	90	–[c]

不同字母表示组间差异显著(P<0.05), 相同字母表示组间差异不显著(P>0.05)。

Different letters indicate significant differences (P<0.05), same letters indicate no significant differences (P>0.05).

Mao et al, 2007b; Zhang et al, 2011)。Ingilæ et al(2000)证实了杀鲑气单胞菌(*Aeromonas salmonicida*)LPS和OMP对鱼类大西洋庸鲽(*Hippoglossus hipoglossus* L.)和花狼鱼(*Anarhichas minor* L.)有较强的免疫原性, 能够刺激鱼体产生相应的抗体, 对杀鲑气单胞菌具有很好的免疫保护效果。Zhou et al (2002)的研究结果表明, 接种一定浓度的嗜麦芽假单胞菌(*Pseudomonas maltophilia*)LPS 可以提高卵形鲳鲹(*Trachinotus ovatus*)对嗜麦芽假单胞菌的抗病力, 能显著提高接种鱼白细胞吞噬能力, 增强接种鱼类的非特异性免疫功能。Huang & Lu (2002)对迟缓爱德华菌(*Edwardsiella tarda*)全菌苗及外膜蛋白的免疫力进行了比较研究, 得到结论, 全菌和OMP均能提供良好的免疫保护, 在有佐剂 LPS 存在下, OMP的效果更好。Mao et al (2007a)报道两种铁调外膜蛋白具有良好的免疫原性, 可作为高效疫苗的候选成分。本研究首次研究并比较了创伤弧菌 LPS、OMP和 FKC 对黄姑鱼免疫保护效果, 结果表明, LPS 和OMP 都能显著地提高黄姑鱼血清抗体凝集效价、溶菌酶活性以及血液中白细胞吞噬活性, 进而提高受免鱼的免疫保护力, 具有很好的免疫原性, 与上述研究结果相似。目前关于创伤弧菌保护性抗原的研究比较少, Jung et al (2005)报道创伤弧菌主要外膜蛋白(MOMP)可诱导哺乳动物模型产生保护性抗体, 免疫接种创伤弧菌MOMP 14 d后, 小鼠IgG水平显著升高, 其中以 IgG2b 的水平最高。本研究的结果证实创伤弧菌 OMP 也可诱导鱼类产生免疫保护性抗体。

抗体是体液中由浆细胞产生的一类能与相应抗原特异性结合的具有免疫功能的球蛋白, 抗体效价反映了鱼类特异性体液免疫水平(Yang et al, 1998; Zhang & Nie, 2000)。LPS、OMP 与 FKC 一样, 也能提高受免鱼的抗体水平。Jian et al (2004)研究发现溶藻弧菌(*Vibrio alginnolyticus*)LPS免疫接种石斑鱼(*Epinephelus Skaara*)28 d凝集抗体效价达到最高, 接种 8 mg/mL LPS 的石斑鱼免疫保护率达到80%。Bader et al (2004)采用 N-lauroylsarcosine 法提取鮰爱德华菌(*Edwardsiella ictaluri*)OMP, 免疫接种斑点叉尾鮰(*Ictalurus punctatus*), 发现免疫 21 d后, 免疫组抗体水平显著高于对照组水平, 同时研究还发现 LPS 和 OMP 联合疫苗刺激机体产生抗体的能力显著高于 OMP 免疫组和对照组。本研究结果表明, 黄姑鱼经 3 种免疫原免疫后, 血清凝集抗体效价缓慢升高, 随后迅速升高, 显著高于对照组水平, 3 个免疫组之间其抗体效价水平由高到低顺序是 FKC 组、OMP 组和 LPS 组。许多研究结果表明, 受免鱼的抗体凝集水平与免疫保护率往往并不一致。Chen et al (1996)用嗜水气单胞菌(*Aeromonas hrdrophila*) F-AH 及其菌体 LPS 作免疫原, 分别接种翘嘴鳜(*Siniperca chuatsi*)28 d 后, 血清中的凝集抗体效价分别为1:1 228.8和1:275.2, 相对免疫保护率分别为 80.7%和 92.7%。Meng et al (2009)报道斑点叉尾鮰接种后 3 种嗜水气单胞菌免疫原后, 其全菌苗血清抗体效价高于 OMP 和 LPS 组, 而相对免疫保护率则低于 OMP 和 LPS 组; Zhang et al (2012)用嗜水气单胞菌 FKC、OMP 和 LPS 为免疫原, 分别免疫青鱼(*Mylopharyngodon piceus*)28 d 后, FKC组、OMP 组和 LPS 组的抗体效价分别为 1:426.67, 1:341.33 和 1:213.33, 免疫 28 d 后活菌攻毒的结果表明, OMP组的免疫保护率为 75%, LPS 组为 67.8%, 均优于 FKC 组(50%)。本研究也发现, 相对于 FKC全菌苗, LPS 和OMP 免疫接种刺激黄姑鱼产生的血清凝集抗体效价稍低, 但能够提供更有效的免疫保护, 分别达到77.8%和66.7%, 高于FKC组水平, 与Chen et al (1996)、Meng et al (2009)和 Zhang et al (2012)的结果相似。这可能是因为受免鱼对全菌苗等抗原产生的免疫应答中, 所产生的抗体并不是全部具有保护性, 虽然 FKC 能诱导受免黄姑鱼产生

比较高的抗体水平，但这些抗体中可能存在一些无效抗体而产生不了保护效果，而提取的 OMP 和 LPS 因为去除了菌体上的部分无效抗原，所以在刺激受免黄姑鱼产生的抗体中，有效抗体所占的比例相对较高，产生高的相对免疫保护力。

本研究中，血清溶菌酶活性和血液白细胞吞噬活性在 28 d 内的变化趋势不同于血清凝集抗体效价的变化，各免疫组血清溶菌酶活性和血液白细胞吞噬活性在免疫后显著升高，免疫 7 d 后显著高于对照组水平($P<0.05$)，而血清凝集抗体效价在免疫接种后逐步增加，在 14 d 后开始迅速升高。在血清溶菌酶活性和血液白细胞吞噬活性开始下降的时候，血清凝集抗体效价却在上升。证实非特异性免疫的启动早于抗体水平的升高。这表明在免疫早期抗体尚未大量形成时，黄姑鱼主要是依靠吞噬细胞数量和吞噬活性的增加来吞噬病原菌以保护机体，吞噬细胞和溶菌酶等体液因子首先发挥重要的非特异性细胞免疫作用，随后是抗体水平升高来抵抗病原菌攻击，特异性体液免疫起主要作用。这与 Zhang et al (2012)关于嗜水气单胞菌 3 种免疫原对青鱼免疫保护效果的研究结果一致。而这种关于鱼类在受免后特异性免疫与非特异性免疫变化的趋势还有待于进一步的研究。

血清凝集抗体效价表现比较低的 LPS 和 OMP 对黄姑鱼表现出了较高的免疫保护力，表明 LPS 和 OMP 是创伤弧菌的主要保护性抗原。然而，本研究采用的 LPS 和 OMP 免疫原是物理和化学方法从菌体中提纯的组分，其制备需要特殊的实验设备和条件，制造过程复杂、成本高，不易于规模化生产，不利于推广应用；另外，这些提纯的 LPS 和 OMP，在主要成分外，还存在着其它糖和蛋白质等可能具有免疫原性的成分，纯度不够，因此，要更好地开发利用这些亚单位疫苗，还需从基因工程角度入手，采用基因克隆、原核或真核表达等技术手段，才能达到规模化生产的能力和效果，才能更好服务于海水养殖鱼类的免疫防治，促进海水养殖的健康可持续发展。

参考文献：

Bader JA, Shoemaker CA, Klesius PH. 2004. Immune response induced by *N-lauroylsarcosine* extracted outer-membrane proteins of an isolate of *Edwardsiella ictaluri* in channel catfish [J]. *Fish Shellfish Immunol,* 2004, **16**(3): 415-428.

Bøgwald J, Stensvag K, Hoffman J, Holm KO, Jørgensen TØ. 1992. Vaccination of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., with particulate lipopolysaccharide antigens from *Vibrio salmonicida* and *vibrio anguillarum* [J]. *Fish Shellfish Immunol,* **2**(4): 251-256.

Chen CF, Li J, Zhou WH, Zhao GZ. 1996. Studies on the immunoprophylaxis against bacterial septicemia in Mandarin fish [J]. *J Huazhong Agric Univ,* **15**(5): 475-479. [陈昌福, 李静, 周文豪, 赵桂珍. 1996. 翘嘴鳜细菌性败血症的免疫预防研究. 华中农业大学学报, **15**(5): 475-479.]

Dalmo RA, Kjerstad AA, Arnesen SM, Tobias PS, Bøgwald J. 2000. Bath exposure of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) yolk sac larvae to bacterial lipopolysaccharide (LPS): Absorption and distribution of the LPS and effect on fish survival [J]. *Fish Shellfish Immunol,* **10**(2): 107-128.

Ingilæ M, Arnesen J A, Lund V, Eggset G. 2000. Vaccination of Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus* L., and spotted wolffish *Anarhichas minor* L., against atypical *Aeromonas salmonicida* [J]. *Aquaculture,* **183**(1-2): 31-44.

Huang XX, Lu CP. 2002. Comparative evaluation of the immune protection of *Edwardsiella tarda* whole cell bacteria and its OMPs [J]. *Immunol J,* **18**(3): 187-189. [黄新新, 陆承平. 2002. 迟缓爱德华氏全菌及外膜蛋白的免疫力比较. 免疫学杂志, **18**(3): 187-189.]

Jian JC, Wu ZH, Chen G, Zeng ML. 2003. Isolation and characteristics of pathogen of *Vibriosis* in cobia (*Rachycentron canadum*) Maricultured in cage [J]. *Chn J Vet Sci,* **23**(4): 329-330. [简纪常, 吴灶和, 陈刚, 曾敏玲. 2003. 海水网箱养殖军曹鱼弧菌病病原的分离及其特性[J]. 中国兽医学报, **23**(4): 329-330.]

Jian JC, Ye JM, Wu ZH. 2004. Influence of lipopolysaccharide from *Vibrio alginolyticus* on immunological function of *Epinephelus Skaara* [J]. *Acta Hydrobiol Sin,* **28**(1): 103-105. [简纪常, 叶剑敏, 吴造和. 2004. 溶藻弧菌脂多糖对石斑鱼免疫功能的影响 [J]. 水生生物学报, **28**(1): 103-105.]

Jung CR, Park MJ, Heo MS. 2005. Immunization with major outer membrane protein of *Vibrio vulnificus* elicits protective antibodies in a murine model [J]. *J Microbiol,* **43**(5): 437-442.

Kawai K, Kusuda R. 1995. *Listonella anguillarum* infection in ayu, Plecoglossus altivelis, and its prevent ion by vaccination [J]. *Israeli J Aquacul,* **47**(3-4): 173-177.

Kawai K, Liu Y, Ohnishi K, Oshima S. 2004. A conserved 37 kDa outer membrane protein of *Edwardsiella tarda* is an effective vaccine candidate [J]. *Vaccine*, 22(25-26): 3411-3418.

Luo L, Chen XX, Cai XF. 2001. Influence of Creat (*Andrographis Paniculata*) on the phagocytic activity of phagocyies in Grass Carp [J]. *J Southwest Agric Univ,* 2001, **23**(1): 33-34, 38. [罗琳, 陈孝煊, 曹雪峰. 2001. 穿心莲对草鱼血液吞噬细胞吞噬活性的影响 [J]. 西南农业大学学报, **23**(1): 33-34, 38.]

Lutwyche P, Exner MM, Hancock REW, Trust TJ. 1995. A conserved *Aermonas salmonicida* porin provides protective immunity to rainbow trout [J]. *Infect Immunol,* **63**(8): 3137-3142.

Ma AM, Yan MC, Chang WS, Chen SB, Shan LZ, Xie QL. 2008. Isolation and identification of *Vibrio vulnificus* from diseased *Nibea albiflora* [J]. *Chn J Zoon,* **24**(10): 960-964. [马爱敏, 闫茂仓, 常维山, 陈少波, 单乐州, 谢起浪. 2008. 黄姑鱼创伤弧菌的分离和鉴定 [J]. 中国人兽共患病学报, **24**(10): 960-964.]

Ma AM, Yan MC, Hu LH, Xie QL, Chen SB, Dan LZ. 2010. Study on immune efficacy induced by killed *Vibrio splendidus* vaccine on

Sciaenops ocellatus [J]. *J Hydroecol,* **3**(3): 137-141. [马爱敏, 闫茂仓, 胡利华, 谢起浪, 陈少波, 单乐州. 2010. 灿烂弧菌灭活疫苗对美国红鱼免疫效果的研究. 水生态学杂志, **3**(3): 137-141.]

Maji S, Mali P, Joardar SN. 2006. Immunoreactive antigens of the outer membrane protein of *Aeromonas hydrophila*, isolated from goldfish, *Carassius auratus* (Linn.) [J]. *Fish Shellfish Immunol,* **20**(4): 462-473.

Mao ZJ, You ZQ, Wei YW, Yu L. 2007a. Cloning, expression and immunogenicity analysis of two iron-regulated outer membrane proteins of *Vibrio parahaemolyticus* ZJ2003 [J]. *J Fish Sci Chn,* **14**(4): 563-569. [毛芝娟, 由振强, 魏永伟, 于涟. 2007a. 副溶血弧菌ZJ2003 株两种铁调外膜蛋白的克隆、表达和免疫原性. 中国水产科学, **14**(4): 563-569.

Mao ZJ, Yu L, You ZQ, Wei YW, Liu Y. 2007b. Cloning, expression and immunogenicty analysis of five outer membrane proteins of *Vibrio parahaemolyticus* zj2003 [J]. *Fish Shellfish Immunol,* **23**(3): 567-575.

Meng XL, Chen CF, Wu ZX, Luo YL. 2009. Comparative study on immunogenicity of three vaccines of *Aeromonas hydrophila* to channel catfish, *Ictalurus punctatus* [J]. *Freshwat Fish,* **39**(4): 49-53. [孟小亮, 陈昌福, 吴志新, 罗宇良. 2009. 嗜水气单胞菌 3 种疫苗对斑点叉尾鮰免疫原性比较研究. 淡水渔业, **39**(4): 49-53.]

Mo ZL, Xu YL, Zhang PJ. 2002. Vaccination Against *Vibrio Anguillarum* on cultured flounder, *Paralichthys olivaceus* [J]. *Marine Sci,* **26**(4): 62-66. [莫照兰, 徐永立, 张培军. 2002. 养殖牙鲆鳗弧菌疫苗的研究. 海洋科学, **26**(4): 62-66.]

Rahman MH, Kawai K. 2000. Outer membrane proteins of *Aeromonas hydrophila* induce protective immunity in goldfish [J]. *Fish Shellfish Immunol,* **10**(4): 379-382.

Reed L J, Muench H. 1938. A simple method of estimating fifty percent end points [J]. *Am J Epidemiol,* 27(3): 493-497.

Shen ZQ, Liu JS, Li F, Xu KL, Wang ZJ, Lu CP, Chu WH. 2001. Isolation and identification of pathogen in *stone flounder* with *Vibrio vulnificus* infection as well as treatment and prevention for the disease [J]. *Chn J Vet Sci Technol*, 31(10): 22-23. [沈志强, 刘吉山, 李锋, 徐可利, 王忠军, 陆承平, 储卫华. 2001. 石鲽鱼创伤弧菌病的病原分离鉴定与防治. 中国兽医科技, 31(10): 22-23.]

Solem ST, Jørgensen JB, Roberrtsen B. 1995. Stimulation of respiratory burst and phagocytic activity in Atlantic salmon (*salmo salar* L.) macrophages by lipopolysaccharide [J]. *Fish Shellfish Immunol,* **5**(7): 475-491.

Westphal O, Jann K. 1969. Bacterial lipopolysaccharides: extraction with phenol-water and further applications of the procedure [J]. *Meth in Carbohyd Chem,* **5**: 83-96.

Xu BF, Lin TL, Dong CF, Yi GH. 2005. Molecular identification of *Vibrio vulnificus* isolated from the diseased *European eels* in mainland China [J]. *Chn J Zoon*, **21**(11): 995-997, 980. [许斌福, 林天龙, 董传甫, 伊光辉. 2005. 鳗鲡创伤弧菌的分子鉴定. 中国人兽共患病杂志, **21**(11): 995-997, 980.]

Yan MC. 2005. Study on Outer Membrane Proteins and Lipopolysaccrides of *Vibrio Harveyi* [D]. Master thesis, Huazhong Agricultural University, 32-40. [闫茂仓. 2005. 哈氏弧菌外膜蛋白和脂多糖的研究[D]. 硕士论文, 华中农业大学, 32-40.]

Yan MC, Chen SB, Shan LZ, Wang XP, Ma AM, Xie QL. 2010. Comparison of different preservation methods for *Vibrio splendidus* and *Vibrio vulnificus* [J]. *J Hydroecol,* **3**(5): 136-140. [闫茂仓, 陈少波, 单乐州, 王雪鹏, 马爱敏, 谢起浪. 2010. 灿烂弧菌和创伤弧菌的不同保存方法比较. 水生态学杂志, **3**(5): 136-140.]

Yang GW, An LG, Wang CF, Wen WJ. 1998. Comparative studies on the immunoglobulin in skin mucus nad serum of carp [J]. *Zool Res,* **19**(6): 489-492. [杨桂文, 安利国, 王长法, 温武军. 1998. 鲤鱼皮肤粘液与血清中免疫球蛋白的比较研究. 动物学研究, **19**(6): 489-492.]

Ye JM, Jian JC, Wu HB, Wu ZH. 2004. Chemical composition of lipopolysaccharides (LPS) from *Vibrio alginolyticus* and toxicity of LPS on *Epinephelus akaara* [J]. *Acta Hydrobiol Sin,* **28**(5): 574-576. [叶剑敏, 简纪常, 吴后波, 吴灶和. 2004. 溶藻弧菌脂多糖的化学成分分析及其对石斑鱼的毒性. 水生生物学报, **28**(5): 574-576.]

Yu LP, Wang B, Li Y, Hu L, Zhao FM. 2008. Isolation and identification of haemorrihagic septicaemia pathogen from cultivated turbot *Scophthalmus maximus* [J]. *J Dalian Fish Univ,* **23**(5): 335-339. [于兰萍, 王斌, 李艳, 胡亮, 赵凤梅. 2008. 大菱鲆出血性败血症病原菌的分离与鉴定. 大连水产学院学报, **23**(5): 335-339.]

Zhang B, Zeng LB, Luo XS, Gao ZY, Zhou Y, An W. 2012. Responses of immune parameters in periphery blood of black carp (Mylopharyngodon piceus) immunized with three vaccines of Aeromonas hydrophila [J]. *J Huazhong Agric Univ,* **31**(1): 100-105. [张波, 曾令兵, 罗晓松, 高正勇, 周勇, 安伟. 2012. 嗜水气单胞菌 3 种疫苗免疫的青鱼外周血免疫指标的变化. 华中农业大学学报, **31**(1): 100-105.]

Zhang YA, Nie P. 2009. Humoral immune factors of fish: a review [J]. *J Fish Chn,* **24**(4): 376-381. [张永安, 聂品. 2000. 鱼类体液免疫因子研究进展. 水产学报, **24**(4): 376-381.]

Zhang YN, Li XY, Geng XN, Zhao BH. 2011. Cloning and expression of a outer membrance protein gene (OMPs2) of *Edwardsiella tarda* HB01 and its immunogenicity [J]. *Chn J Cell Mol Immunol,* **27**(10): 1075-1079. [张亚宁, 李晓玥, 耿晓娜, 赵宝华. 2011. 迟缓爱德华菌HB01外膜蛋白OmpS2基因的克隆表达及其免疫原性研究. 细胞与分子免疫学杂志, **27**(10): 1075-1079.]

Zhao DH, Liu LB, Sun JJ, Wang HF, Liang LQ, Zhao HH, Liu L, Li G F. 2007. Histopathology of ovate pompano Trachinotus ovatus infected with *Vibrio damsela* and *Vibrio vulnificus* [J]. *J Dalian Fish Univ,* **22**(6): 455-459. [赵典惠, 刘丽波, 孙际佳, 王海芳, 梁兰清, 赵会宏, 刘丽, 李桂峰. 2007. 用美人鱼弧菌与创伤弧菌人工感染卵形鲳鲹的组织病理学研究. 大连水产学院学报, **22**(6): 455-459.]

Zhao F. 2005. Effects of Rapeseed Meal on the Immune Function of *Carassius Auratus* Gibelio [D]. Master thesis, *Huazhong Agric Univ*, 18-19. [赵飞. 2005. 菜籽粕对异育银鲫免疫机能的影响[D]. 硕士论文, 华中农业大学, 18-19.]

Zhou YC, Zhang B, Chen XF, Qian JY. 2002. Preparation of *Pseudomonas maltophilia* lipopolysaccharidae and immunological analysis of the lipopolysaccharide against *Trachinotus ovatus* [J]. *J Fish Chn,* **26**(2): 143-148. [周永灿, 张本, 陈雪芬, 钱家英. 2002. 嗜麦芽假单胞菌脂多糖的置备及其在卵形鲳鲹中的免疫反应. 水产学报, **26**(2): 143-148.]

2012年昆明秀丽线虫研讨会顺利召开

昆明秀丽线虫学术研讨会于2012年8月3日至8月5日在中国科学院昆明动物研究所顺利召开。本次会议由中国科学院昆明动物研究所、中国科学院昆明植物研究所和云南大学联合组织，昆明动物研究所主办。来自北京生命科学研究所、中国科学院上海神经科学研究所、中国科学院生物物理研究所、中国科学院遗传和发育研究所、中国科学技术大学、首都师范大学、云南大学、云南农业大学、同济大学、中南大学、华中科技大学、浙江大学、上海交通大学、中国科学院昆明植物研究所和中国科学院昆明动物研究所的20多位专家学者参加了会议。

8月4日，与会专家在中国科学院昆明动物所学术报告厅，与昆明动物所、昆明植物所和云南大学的师生相聚一堂，向大家分享他们研究秀丽线虫的重要成果和心得。会议由中国科学院昆明动物研究所梁斌研究员主持。首先，来自北京生命科学研究所的张宏研究员发表了简短的致辞：他总结了目前国内秀丽线虫研究的良好发展态势，并就秀丽线虫研究材料、方法和技术等资源共享平台的建设，扩大相互间的合作和交流，推动国内秀丽线虫研究工作，和与会专家深入地交换意见，获得了广泛共识。

接着，各位专家就各自研究领域分别为大家做了精彩的学术报告。机械性介导的压力感受器对于触觉，机械力引起的痛觉、听觉、平衡感的形成至关重要，但是其具体的作用机制不太清楚。浙江大学基础医学院的康利军研究员介绍了利用全细胞膜片钳技术记录活体线虫神经元电生理活动，揭示TRP-4通道在感受机械性压力中的重要作用，及其介导触觉生成过程中的分子机制。钾离子通道在几乎所有生物体中存在，并在生命的各个过程中有重要参与，如在衰老过程中，钾离子通道氧化引起感觉功能丧失。来自中科院上海神经科学研究所的蔡时青研究员利用反向遗传学的方法，筛选秀丽线虫中影响钾离子通道功能的相关基因，进一步阐述秀丽线虫中钾离子通道的功能和调控机理。RNA剪接是调控真核基因表达的主要机制之一，RNA剪接和许多疾病相关。中南大学医学遗传学国家重点实验室的马龙教授研究组通过遗传筛选，在秀丽线虫中发现*tos-1*基因可以作为RNA剪接的标志物，其剪切受到*uaf-1*和*saf-1*基因的影响；并且他们还发现*mfap-1*基因能抑制*unc-93*突变株的表型，能改变*tos-1*基因的剪接，从而证实*mfap-1*也是一个RNA剪接关键因子，这一研究对了解RNA剪切及其相关的人类疾病开拓了新的视野。中国科技大学的单革教授也介绍了大肠杆菌的内源非编码RNA与秀丽线虫基因表达及生理表现之间的密切联系，发现OxySRNA和DsrARNA是不同条件处理的大肠杆菌表达的非编码RNA，影响秀丽线虫的进食和生理表现，并对其机理进行了深入的研究。

随后，中科院生物物理所刘平生研究员详细介绍了他们对于脂滴在代谢性疾病、生物能源和进化三大方面的研究，展示了他们在脂滴膜蛋白共性、脂滴形成及动态变化、脂滴起源等三个重大科学问题上取得的最新成果。他们最近完成了秀丽线虫脂滴的分离和纯化，脂滴蛋白组学研究发现了两个在脂滴表面表达的基因*mdt-28*和*dhs-3*，能够作为秀丽线虫脂滴的特异标志物，追踪脂滴形成的变化、检查秀丽线虫脂肪含量及其调控机制。他们同时发现脂滴的积累可能与心衰有关，特别是脂肪水解酶ATGL功能失常是导致心脏脂肪积累、心衰的主要原因。另外，他课题组发现并分离了一种高效富集油脂的细菌，并试图将之与光合蓝细菌相重组，对于推动生物柴油的开发有着重大意义。

最后，华中科技大学生命科学与技术学院吴政星教授带领的课题组利用秀丽线虫，用可以显著提高或降低秀丽线虫摄食速率的化学物质加以处理，筛选可以恢复秀丽线虫正常摄食速率的基因，从而阐明线虫在选择喜欢的食物和逃避不喜欢食物时的两条摄食调节路径的分子机制，以及5-HT、tyramine/octopamine和它们的受体在促进和抑制秀丽线虫摄食过程中的相互作用关系。吴政星研究员的报告使大家对秀丽线虫的摄食行为及其调节有了更深的了解。

研讨会学术气氛热烈，与会专家和听众进行了广泛的讨论，提出了很多宝贵的意见和建议，现场师生相互受益匪浅。本次会议的顺利召开，对于活跃学术氛围，促进国内秀丽线虫研究人员间的合作交流起到了非常重要的推动作用，并对促进国内秀丽线虫研究的发展，提高秀丽线虫的研究水平具有重要意义！

丁毅弘，梁 斌

（中国科学院和云南省动物模型与疾病机理重点实验室，昆明动物研究所，昆明，教场北路32号，650223）

动 物 学 研 究 2012，Oct. 33(5): 511−522 CN 53-1040/Q ISSN 0254-5853
Zoological Research DOI：10.3724/SP.J.1141.2012.05511

非人灵长类位置行为的辐射适应与研究进展

张 晶[1]，齐晓光[1,*]，张 堪[1]，张 培[1]，郭松涛[1]，魏 玮[1]，李保国[1,2,*]

(1. 西北大学 生命科学学院, 教育部西部资源生物与现代生物技术重点实验室, 西安 710069; 2. 陕西省科学院动物研究所, 西安 710032）

摘要：野生动物在长期进化中形成特定的行为模式以适应特定的生存环境。灵长类的位置行为研究对于理解灵长类进化、适应性的多样化以及生态学和解剖学十分关键。该文对已有文献进行了综述, 针对位置行为的分类、季节性、以及具体地点和年龄性别差异性进行了总结, 分析了灵长类位置行为的发展、特征以及研究现状, 以期对今后非人灵长类位置行为的研究提供借鉴和参考, 从而促进我国灵长类行为生态学理论体系的发展。

关键词：非人灵长类; 位置行为; 移动; 姿势
中图分类号：Q959.848 **文献标志码**：A **文章编号**：0254-5853-(2012)05-0511-12

Diversity and development of positional behavior in non-human primates

ZHANG Jing[1], QI Xiao-Guang[1,*], ZHANG Kan[1], ZHANG Pei[1], GUO Song-Tao[1], WEI Wei[1], LI Bao-Guo[1,2,*]

(1. *College of Life Sciences*, *Northwest University*, *Key Laboratory of Resource Biology and Biotechnology in Western China of Ministry of Education*, *Xi'an* 710069, *China*; 2. *Institute of Zoology*, *Shaanxi Academy of Sciences*, *Xi'an* 710032, *China*)

Abstract: In long-term evolution, wildlife in general and primates in particular have formed specific patterns of behavior to adapt to a diverse variety of habitat environments. Current research on positional behavior in non-human primates has been found to explain a great deal about primate adaptability diversification, ecology, anatomy and evolution. Here, we summarize the noted classifications and differences in seasonal, site-specific and sex-age positional behaviors while also reviewing the development and status of non-human primate positional behavior research. This review is intended to provide reference for the future research of non-human primates and aid in further research on behavioral ecology of primates.

Key words: Nonhuman primates; Positional behavior; Locomotor behavior; Postural behavior

野生动物在长期进化中形成特定的行为模式以适应特定的生存环境(Jiang, 2004)。这些行为模式不仅取决于个体体型大小和解剖学特征, 还取决于非生物环境(如温度、降雨)和生物环境(栖息地结构、物种丰富度、资源分布及可获得性)的空间差异(Garber, 2007; Prates & Bicca-Marques, 2008)。因此, 开展动物行为模式研究将有助于了解动物对其栖息生境的行为适应机制(Jiang, 2004; Garber, 2007)。

在早先的树栖生活环境中, 灵长类表现成功的辐射型进化。其种间甚至种内运动模式十分多样且存在极大差异, 这些差异体现在种间或个体间为获取食物资源而开发利用环境的途径(Niemitz, 1984; Cant, 1986)、躲避天敌、以及移动时的能量消耗等方面(Oxnard et al, 1990; Hunt, 1991; Garber, 1992; Anemone, 1993)。由于灵长类世系开采生活环境能力的重要进化与位置行为和位置生态学相关, 因此, 灵长类位置行为研究对于理解灵长类适应性的多样化非常关键(Garber, 2007), 而位置行为研究的主要目的则是理解种群与自然环境的相互作用以及适应的进化性关系。

目前, 已有较多学者关注此方面的研究及成果, 国外关于非人灵长类位置行为的研究也已展开, 但

收稿日期：2012-03-20；接受日期：2012-06-01
基金项目：国家自然科学基金 (31130061, 30900168, 30970444)；国家大学生创新性实验计划项目(101069711)
*通信作者(Corresponding authors)，E-mail: qixg@nwu.edu.cn; baoguoli@nwu.edu.cn
第一作者简介：张晶, 女, 硕士; 主要从事灵长类行为生态学研究; E-mail: youha0816@sina.com

国内还鲜有报道。本文对已有文献进行了综述，分析灵长类位置行为的分类、发展、特征以及研究现状，以期对今后非人灵长类位置行为的研究提供借鉴和参考。

1 位置行为概述

1.1 位置行为的定义

位置行为(positional behavior)是动物为了适应不同生活环境而采取的不同生存应对策略。灵长类位置行为对其活动和环境的具体情况有具体的针对性。也就是说，某一位置行为(进食 vs 移动 vs 休息)在特定活动中或在某一特定直径、方向和承重能力的支撑物上会发生的更为频繁(Ripley, 1967; Kinzey, 1967; Garber, 1980, 1998; Bergeson, 1998)。

1.2 位置行为的分类

位置行为研究是灵长类肢体运动模式研究的一种更为准确的说法(Prost, 1965)。其研究内容主要包括两部分：姿势行为(postural behavior)和移动行为(locomotor behavior)(Garber, 1984)。姿势行为即当一个个体的重心保持相对稳定，四肢部分抓握适当可发生相对移动的一系列目的性行为(Prost, 1965)。姿势行为在进食和休息中较常见(坐、躺、四脚站立、抓握、通过两个或三个肢体悬挂等)。而移动行为则是指个体的重心发生相对移动时四肢的运动情况，常与个体移动、觅食和躲避天敌等行为有关。移动是一种达到目的的手段，例如，为寻找食物或休息地而移动，为逃离捕食者而快速跑跳，或进行社交行为等。奔跑、攀爬和跳跃都是常见的移动行为。

Hunt et al (1996)对灵长类的位置行为模式进行了标准化定义。他们认为不一致的传统术语和不正确的模式分类阻碍了各研究间的互相比较。一些研究者未按照定义使用常用词汇，而是在记录中使用自己针对某物种而定义的词汇，从而阻碍了非人灵长类位置行为的对比研究。还有一些研究人员创造新词以适用于其研究的物种，但却无法将其应用于其他物种的位置行为模式，且此类新词与已有的标准定义可能会部分重叠、完全涵盖或混淆，从而使得原本清晰的定义变得混乱。许多学者认为，目前有 3 个方面的行为方式的区分很重要：(1) 肱骨外展的行为应有别于肱骨内收的行为；(2) 竖直方向的移动应有别于水平方向的移动；(3) 悬吊行为应区别于有支撑物的行为。

Hunt et al (1996)形象地定义了 32 种灵长类位置行为，其中包括 14 类姿势行为和 18 类移动行为：

1.2.1 姿势行为(定义框架来源于 Hunt et al, 1996)

ZS1 (坐, sit)：由坐骨承担一半以上体重。包括：ZS1-a (静坐, sit-in)，即由坐骨和脚共同承重，脊椎弯曲(Fleagle, 1978)，躯干直立；ZS1-b (久坐, sit-out)，与 ZS1-a 的不同在于脚仅用于维持平衡而不承重，后肢伸展，脚伸向外；ZS1-c (后肢撑坐, foot-prop sit)，与 ZS1-a 相似，后肢由脚支撑，躯干由前肢支撑；ZS1-d (坐骨正坐, ischium-sit)，即仅由坐骨(包括坐胼胝)承重；ZS1-e (座椅正坐, chair-sit)，即躯干直立，坐骨和背部承担大部分体重，如同人类坐在椅子上，故称为座椅正坐；ZS1-f (坐/前肢悬挂, sit/forelimb-suspend)，即由前肢抓附支持物以稳定身体并承担一部分体重(图 1a,b)(Hunt et al, 1996)。

ZS2 (蹲, squat)：体重靠脚或脚、髋关节和膝关节的同时强烈弯曲来支撑，前肢和坐骨不承重，背部弯曲(Hunt et al, 1996)。

ZS3 (抓握依附, cling)：该曲肢姿势常见于垂直或接近垂直的支撑物。包括：ZS3-a (双手依附, bimanual cling)，即垂直依附(vertical cling)，通常肘部、膝关节和髋关节均弯曲，前肢内收抱住支撑物，躯干笔直或弯曲，后肢至少承受一半的体重(图 1c)，坐骨不承重；ZS3-b (单手依附, unimanual cling)，与双手依附类似，但仅由一只前肢抓住支持物，另一前肢弯曲；ZS3-c (依附/前肢悬挂, cling/forelimb-suspend)，与单手依附不同的是，未抓住支持物的前肢以悬臂方式伸张(Hunt et al, 1996)。

ZS4 (站立, stand)，常见姿势包括：ZS4-a (四足站立, quadrupedal stand)，四肢站在水平支撑物上，肘部和膝盖相对伸展，躯干近乎水平(图 1d)；ZS4-b (三足站立, tripedal stand)，与四足站立类似，但仅由两后肢和其中一前肢承重(如：狒狒，图 1e)；ZS4-c (蜷缩, crouch)；ZS4-c-1(完全蜷缩)，肘部和膝盖弯曲；ZS4-c2 (前肢蜷缩)，肘部弯曲，膝盖不弯曲；ZS4-c-3(后肢蜷缩)，膝盖弯曲，肘部不弯曲(Hunt et al, 1996)。

ZS5 (双足站立, bipedal stand)，包括：ZS5-a (双足弯曲站立, flexed bipedal stand)，在身体其他部位无明显支撑的情况下使用后肢站立，躯干通常弯曲～45°，髋关节和膝关节均弯曲(图 1f,g)；ZS5-b (双足伸展站立, extended bipedal stand)，与人类的

双足站立类似，髋关节和膝关节完全伸展且前肢无明显支撑作用，躯干直立；ZS5-c (站立/前肢悬挂，stand/forelimb-suspend)，前肢承担一半以上的体重，后肢也有明显的支撑作用(Hunt et al, 1996)。

ZS6 (三角支撑, tripod)，包括两种方式：ZS6-a (水平三角支撑, horizontal tripod)，即尾巴悬挂于支撑物上与双足共同承重，躯干水平或近似水平(Fontaine, 1990)；ZS6-b (垂直三角支撑，vertical tripod)，双足弯曲站立，尾巴保持僵硬并与地面有力接触以维持身体稳定(Hunt et al, 1996)。

ZS7 (悬臂, cantilever)：双脚固定下半身以保持平衡，身体与支撑物近乎垂直，躯干伸直，并可伸出一只前肢捕获食物(图 1h)。包括：ZS7-a (水平悬臂，extended cantilever)，膝关节与身体伸展，常见于懒猴科和鼠狐猴科动物；ZS7-b (倾斜悬臂，lean out cantilever)，膝关节弯曲(如：眼镜猴) (Hunt et al, 1996)。

ZS8 (前肢悬挂, forelimb-suspend, arm-hang)：即前肢抓握位于其重心上方的支持物且承担一半以上的体重。包括：ZS8-a (单臂悬挂，unimanual forelimb-suspend)，即其中一只前肢抓握悬挂，肱骨弯曲，肘部完全伸展，躯干垂直，身体其他部分可能支撑少量体重(图 1i)；ZS8-b (双臂悬挂, bimanual forelimb-suspend)：两前肢抓握悬挂(YD12，但尾巴不支撑身体)；ZS8-c (前肢悬挂/坐，forelimb-suspend/sit)，与坐/前肢悬挂类似，但由前肢(而非坐骨)承担一半以上体重；ZS8-d (前肢悬挂/蹲，forelimb-suspend/ squat)，前肢抓握支撑物使上半身悬挂的蹲坐形态；ZS8-e (前肢悬挂/站立，forelimb-suspend/stand)，前肢抓握悬挂且双足站立承担部分体重，躯干倾斜≥45°; ZS8-f (前肢悬挂/趴，forelimb-suspend/cling)，前肢抓握支撑物，后肢弯曲并承担近一半的体重；ZS8-g (前肢悬挂/躺，forelimb-suspend/lie)，上半部分身体悬挂的躺姿；ZS8-h (躯干垂直悬挂, trunk-vertical-suspend)，前、后肢任意组合抓握悬挂以支撑身体，四肢紧绷，躯干直立(如，猩猩) (Hunt et al, 1996)。

ZS9 (后肢悬挂, hindlimb-suspend)：即使用一只或两只后肢悬挂。包括：ZS9-a (后肢弯曲悬挂，flexed-hindlimb-suspend)，膝关节和/或髋关节弯曲；ZS9-b (后肢伸展悬挂 extended-hindlimb-suspend)，膝关节和髋关节均伸展(Hunt et al, 1996)。

ZS10 (前后肢悬挂 forelimb-hindlimb-suspend, arm-foot hang)：即使用任一前肢和任一后肢悬挂，四肢伸展，与前肢悬挂不同的是，躯干处于近乎水平方向(如：猩猩，图 1j)。包括：ZS10-a (身体同侧的前后肢悬挂，ipsilateral forelimb-hindlimb-suspend)，即用身体同一侧的前肢和后肢抓握悬挂，躯干水平；ZS10-b (身体对侧的前后肢悬挂，contralateral forelimb-hindlimb-suspend)，即用任一前肢和对侧后肢抓握悬挂，躯干水平(Hunt et al, 1996)。

ZS11 (四肢悬挂, quadrumanous-suspend)：即躯干水平悬挂，四肢所提供的支撑力几乎相等(Hunt et al, 1996)。

ZS12 (尾巴悬挂 tail-suspend)，包括：ZS12-a (尾巴悬挂，tail-suspend)，即由尾巴承担大部分体重，四肢几乎不承重；ZS12-b (尾巴/前肢悬挂，tail/forelimb-suspend)，尾巴承担至少一半的体重，前肢也有承重，肱骨外展，肘部完全伸展(图 1k)；ZS12-c (尾巴/后肢悬挂，tail/hindlimb-suspend)，体重基本由后肢和尾巴支撑；ZS12-d (直立行走尾巴/四肢悬挂，orthograde tail/quadrumanous-suspend)，四肢和尾巴均承重，躯干垂直；ZS12-e (俯身行走-尾巴/四肢悬挂，pronograde tail/quadrumanous-suspend)，四肢和尾巴均承重，躯干水平(Hunt et al, 1996)。

ZS13 (躺, lie)：即在一个近乎水平的支撑物上，躯干保持伸直并承担大部分体重，侧躺时个体可能会用肘部来支撑身体。主要方式包括：ZS13-a (仰躺，supine lie)，四肢可能会在身下弯曲，也可能会承受一些重量，腹部和手或脚所承担的重量几乎相同(Fontaine, 1990)；ZS13-b (四肢伸展躺，sprawl)，通常发生在个体在树枝上以腹部支撑着休息时，四肢自然垂悬，有时是为了凉爽(图 1 l; Fontaine, 1990)；ZS13-c (背躺，back lie)，主要依靠背部支撑体重；ZS13-d (侧躺, lateral lie)，体重主要靠单侧身体支撑；ZS13-e (坐/躺, sit/lie)：坐着休息，身体上半部分由肘部支撑(Hunt et al, 1996)。

ZS14 (架桥姿势, postural bridge)：即由后肢抓住河流、树枝等间隙一边的支持物，前肢抓住另一边的支持物，以使身体跨过间隙，母猴有时会将其身体作为婴猴渡过间隙的桥梁(Hunt et al, 1996)。

1.2.2 移动行为(定义框架来源于 Hunt et al, 1996)

YD1 (四肢行走, quadrupedal walk)：即在倾角<45°的支持物上移动，身体匍匐且与支撑物近似平

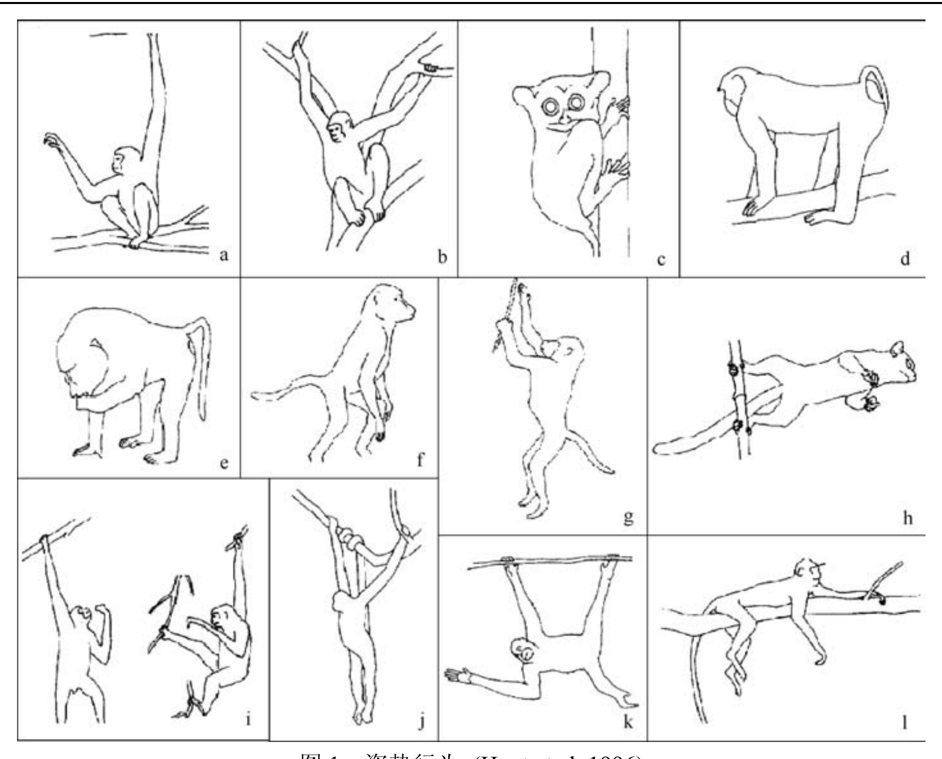


图 1 姿势行为 (Hunt et al, 1996)

Fig. 1 Postural behavior (Hunt et al, 1996)

a, b) 坐/前肢悬挂(sit/forelimb-suspend); c) 双手依附(bimanual cling); d) 四足站立(quadrupedal stand); e) 三足站立(tripedal stand); f, g) 双足弯曲站立(flexed bipedal stand); h) 悬臂(cantilever); i) 单臂悬挂(unimanual forelimb-suspend); j) 尾巴/前肢悬挂(tail/forelimb-suspend); k) 前后肢悬挂(forelimb-hindlimb-suspend); l) 四肢伸展躺(sprawl)。

行, 四肢与支撑物有序接触, 行走与奔跑的主要区别在于行走速度较慢。包括：YD1-a (对称步态行走, symmetrical gait walk), 分为行走和蹲伏行走, 前者通常是四肢以对角线顺序与支撑物接触, 四肢伸直，后者与前者相似，但肘部和膝盖弯曲，以使身体更靠近支撑物而更加稳定(图 2a); YD1-b (非对称步态行走, asymmetrical gait walk); YD1-c (不规则步态行走, irregular gait walking)。其中 YD1-b 可具体分为以下几类：YD1-b-1 (跳跃), 前、后肢同时向前移动, 身体同侧肢体同时抓住支撑物; YD1-b-2 (三肢跳跃), 与 YD1-b-1 类似, 但仅使用一只前肢; YD1-b-3(慢跳), 与 YD1-b-1 类似, 速度低; YD1-b-4(倚靠行走), 躯干垂直前进(在陆地上), 后肢移动时躯干在两前肢间来回交替, 且几乎只出现于跳跃的急剧降落阶段; YD1-b-5(经轴跳跃,Transaxial bound); 前、后肢同时接触支持物, 步长相当长且背部伸展, 移动时后肢会跨过前肢; YD1-b-6(不完全跳跃), 只有一组肢体(前肢或后肢)同步移动。YD1-c 可具体分为以下几类：YD1-c-1(攀爬),即匍匐攀爬, 步态无规律; YD1-c-2 (缓步行走, tardigrady), 缓慢的匍匐前进, 每次只移动其中一只四肢, 且这种移动行为包括许多不规则肢体移动(Hunt et al, 1996)。

YD2 (三肢行走, tripedal walk)：与四肢行走类似, 但移动时仅使用三个肢体, 剩下的一个肢体通常用于搬运物体。包括：YD2-a (前肢式三肢行进), 两前肢用于行进, 一个后肢用于搬运物体; YD2-b(后肢式三肢行进), 两后肢用于行进, 一个前肢用于搬运物体(Hunt et al, 1996)。

YD3 (两足行走, bipedal walk), 包括：YD3-a (伸展式两足行进, extended bipedal walk), 后肢提供支持力和推进力, 臀部和膝盖均伸展, 与人类行走类似; YD3-b (弯曲式两足行进, flexed bipedal walk), 与 YD3-a 类似, 但臀部和膝盖相对较弯曲(图 2b) (Hunt et al, 1996)。

YD4 (四肢奔跑, quadrupedal run)：利用非对称或不均匀步态迅速移动, 有一个自由飞跃的阶段。包括：YD4-a (非对称式奔跑, asymmetrical gait run), 多为急速的跳跃和不完全跳跃; YD4-b (不规则式奔跑, irregular gait run), 步法无规律的快速移动(Hunt et al, 1996)。

YD5 (三肢奔跑, tripedal run)：仅其中三个肢体

与地面接触的急速移动(Hunt et al, 1996)。

YD6 (两足奔跑, bipedal run)：该过程中包含一个自由飞跃的阶段, 而大多数灵长类的“跑”实际上是快速的行走, 无飞跃阶段(Hunt et al, 1996)。

YD7 (两足跳跃, bipedal hop)：两后肢几乎同时蹬起着地, 包含一个自由飞跃的阶段(身体的任何部分均不接触支撑物), 躯干直立(Hunt et al, 1996)。

YD8 (垂直攀爬, vertical climb), 包括：YD8-a (垂直攀爬, vertical scramble), 在各种角度的树枝上攀爬, 支撑物向上>45°倾角均可认为是垂直攀爬; YD8-b (曲肘式垂直攀爬, flexed-elbow vertical climb), 在倾角≥45°的树枝上攀登, 四肢的移动遵循对角线顺序, 身体匍匐几乎与正在攀爬的树枝平行(图 2c); YD8-c (伸肘式垂直攀爬, extended-elbow vertical climbing), 在倾角>45°的大型支撑物上(对于黑猩猩和狒狒来说直径>20 cm)攀爬, 与垂直和梯式攀爬相似, 但肘部伸展(图 2d); YD8-d (梯式攀爬, ladder climb), 与曲肘式攀爬相似, 单支撑物通常是相对水平的, 该行为与人以对角线式的步法爬梯子类似; YD8-e (跳跃攀爬, pulse climb), 即垂直跳跃(vertical bound), 在倾角>45°的树枝上移动, 前肢抓住支撑物, 后肢收缩在身下, 后肢和背部的伸展所产生的推进力促使身体向上, 同时前肢放开支撑物去抓取另一更高的支撑物; YD8-f (前肢提升, bimanual pull-up)：即牵引或提升(hauling or hoisting), 前肢抓住一水平支持物, 以肘的收缩和伸展来提升身体, 脊柱弯曲以便将后肢牵引到支撑物上; YD8-g (头部优先下降, head-first descent), (该姿态可具体分为： YD8-g-1(对称式头部优先下降),与四肢行走类似, 且前肢在急剧的下降过程中有制动的作用(可能出现滑行); YD8-g-2(非对称式头部优先下降), 在一些倾角、粗细各异的树枝间下降(与对称式相似), 步法不对称; YD8-g-3(瀑布式下落), 与 YD8-g-2 相似, 但作为支撑物的树枝较小且纵横交错, 四肢和尾巴在下降过程中起连续制动作用); YD8-h (头部优先跳跃式下降, head-first bounding descent)：两前肢首先一起移动, 两后肢随后一起移动, 四肢均有制动作用; YD8-i (尾部优先下降, rump-first descent), [该姿态可具体分为：YD8-i-1(对称式尾部优先下降), 在倾角>45°的支撑物上四肢垂直下降(相当于与向上攀爬相反); YD8-i-2(非对称式尾部优先下降), 在方向、粗细各异的树枝间下降]; YD8-j (侧面垂直下降, sideways vertical descent), 身体与支撑物的轴线垂直、处于身体下方的前后肢提供主要的制动力; YD8-k (匍匐滑动, pronograde slide), 头部在前, 四肢紧握支撑物, 在光滑、倾斜的树枝上被动下降, 身体通过前、后肢及其他部位与支撑物之间的滑行而移动, 身体匍匐并与支持物保持平行; YD8-l (摩擦支撑滑行, fire-pole slide), 臀部在前, 在较粗的(直径>20 cm)垂直或近似垂直的支撑物上被动滑行, 躯干直立, 四肢环抱支撑物, 依靠身体其他部分的微小滑动来下降, 并可通过前肢来调整下降速率(Hunt et al, 1996)。

YD9 (平行悬吊式移动, torso pronograde suspensory locomotion), 包括：YD9-a (四肢倒挂行走, inverted quadrupedal walk), 四肢以各种组合并用, 躯干匍匐, 四肢紧张, 通常步法有序; YD9-b (四肢倒挂奔跑, inverted quadrupedal run), 同 YD9-a, 但速度较快; YD9-c (倒挂式攀爬, inverted scramble), 同 YD9-a(在不规则倾角与大小的支持物上) (Hunt et al, 1996)。

YD10 (垂直悬吊式移动, torso-orthograde suspensory locomotion), 包括：YD10-a (十字式臂荡前进, brachiate), 一只前肢接替另一前肢的直立悬吊式移动, 该姿态在灵长类中十分常见, 前肢承受大部分体重, 后肢与尾巴有时也会承担部分体重, 身体有较大的旋转角度(~180°), 肱骨外展且肘部伸展, 在新大陆猴中该行为需要尾巴的协助(图 2e); YD10-b (十字式跳跃前进, brachiating leap), 借助于迅速十字式前进的惯性, 单臂摇摆推进身体向前; YD10-c (十字式弹跳前进, ricochetal brachiation), 一只前肢接替另一前肢的直立悬吊移动, 包含一个自由飞跃的过程, 相对十字式臂荡前进更为迅速, 该模式需要尾巴协助; YD10-d (前肢摇摆, forelimb swing, arm swing), 与十字式前进类似, 但伴随些许身体的旋转, 在新大陆猴中通常需要尾巴缠绕协助; YD10-e (屈肘式前臂摇摆, flexed-elbow forelimb swing), 与 YD10-d 相似, 但肘部弯曲; YD10-f (转移, transfer), 该移动行为通常由两前肢的悬挂开始, 包括一个十字式前进的间隙结束动作(一个跃进), 通过前肢的不断转换将身体逐渐过渡到邻近的支撑物上, 躯干保持一定程度的竖直, 在新大陆猴中通常需要尾巴协助; YD10-g (直立攀爬, orthograde clamber, cautious climbing, amoebic suspensory locomotion), 前肢悬挂的水平前进, 躯干垂直, 后肢提供协助, 四肢均有推进作用, 向外伸展的前肢

承受大部分体重; YD10-h (遏制式下降, arrested drop), 从一个支撑物顶端向下移动, 以坐着或外展的前肢、伸展的肘部而支撑的身体发起, 躯体保持直立下降, 个体移动到支撑物下端时臀部先着地(Hunt et al, 1996)。

YD11 (桥渡, bridge), 包括: YD11-a (匍匐桥渡, cautious pronograde bridge), 躯体匍匐, 小心跨过障碍物间隙的移动方式; YD11-b (跃进式桥渡, lunging bridge), 脚掌或尾巴抓住支持物然后以一个跃进跨过障碍物间隙, 以使前肢抓住另一个较远的支撑物(图 2f); YD11-c (悬挂式桥渡, supinograde bridge), 同 YD11-b, 同时悬挂; YD11-d (垂直向上桥渡, upward vertical bridge), 同 YD11-b, 但前进方向的角度≥45°; YD11-e (下降式桥渡, descending bridge), 由后肢悬挂开始的不完整跳跃, 前进方向的角度≤45°(Hunt et al, 1996)。

YD12 (猛冲, scoot): 身体依靠滑动产生的力向前, 坐骨承担大部分体重, 当身体被推进向前时膝盖和大腿仍保持弯曲(Hunt et al, 1996)。

YD13 (飞跃 leap), 一种跨越横沟的运动模式, 后肢提供主要推进力, 包含躯体伸展的自由飞跃阶段(与弹跳不同)。包括: YD13-a (匍匐飞跃, pronograde leap), 躯体在起跳时处于匍匐状态; YD13-b (泵式飞跃, pumping leap), 与匍匐飞跃类似, 加强树枝上的摇摆动作, 以此来增加飞跃距离; YD13-c (前后肢悬挂式飞跃, hindlimb-forelimb suspensory leap), 前、后肢任意组合悬挂, 并在起跳时提供推进力; YD13-d (后肢悬挂式飞跃, hindlimb suspensory leap), 由一个或两个后肢悬挂开始的飞跃, 前肢前伸; YD13-e (垂直依附型飞跃, vertical clinging leap), 起始动作为躯体直立依附于一个相对垂直的支撑物, 后肢提供推进力, 与匍匐飞跃的区别在于起始的依附(图 2g)(Hunt et al, 1996)。

YD14 (下落, drop): 与飞跃的区别在于起跳不是由肌肉的推进作用开始, 而是在松开一个支撑物后降落时发起的。包括: 双足下落, 四肢下落, 单手下落, 前肢悬挂式下落, 屈肘式悬挂下落, 尾吊式下落, 后肢悬挂式下落和前后肢悬挂式下落等(Hunt et al, 1996)。

YD15 (摇尾, tail swing): 尾巴悬挂时的摆动推动动物跨过间隙(Hunt et al, 1996)。

YD16 (飞跃、下落、摇尾时的着陆, landings for leap, drop, and tail swing), 包括: YD16-a (前肢落地,

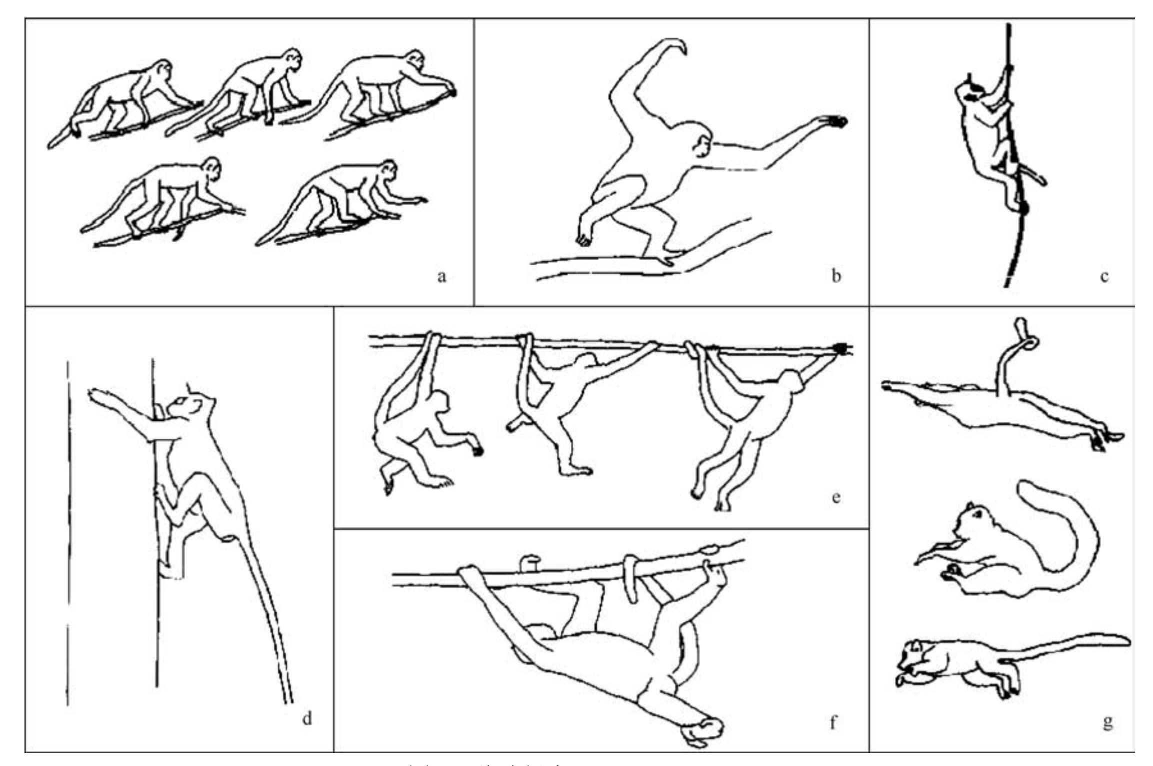


图 2 移动行为 (Hunt et al, 1996)

Fig. 2 Locomotor behavior (Hunt et al, 1996)

a) 对称步态行走(asymmetrical gait walk); b) 弯曲式两足行进(flexed bipedal walk); c) 曲肘式垂直攀爬(flexed-elbow vertical climb); d) 伸肘式垂直攀爬(extended-elbow vertical climbing); e) 十字式臂荡前进(brachiate); f) 跃进式桥渡(lunging bridge); g) 垂直依附型飞跃(vertical clinging leap)。

forelimb landing), 前肢起主要的缓冲作用, 身体始终保持相对匍匐; YD16-b (前肢悬挂落地, suspensory forelimb landing), 通常伴随前肢悬挂; YD16-c (前后肢悬挂落地, hindlimb-forelimb suspensory), 前后肢(主要为前肢)任意组合完成缓冲; YD16-d (双足落地, bipedal landing), 后肢先着地并弯曲以进行缓冲, 主要发生在有垂直依附起跳的飞跃后; YD16-e (四肢落地, quadrupedal landing), 四肢弯曲以进行缓冲, 前后肢的触地时间略有间隔, 通常前肢先着地(Hunt et al, 1996)。

YD17 (树上摇摆, tree sway)：在树木间跨越间隙的移动方式, 摇摆树以增加树枝的摆动幅度, 或者利用体重以使树枝弯曲直至可以接触到另一棵树。与桥渡不同, 树上摇摆利用的是体重和摆动而不是跃进(Hunt et al, 1996)。

YD18 (骑跨, ride)：与树上摇摆相似, 但该行为是从树上到地面, 个体依附于一个垂直细小的树枝上, 依靠摇摆或运动打破支撑物的平衡, 体重使得树从垂直变成水平, 之后, 个体形成一个悬挂的动作, 随后后肢松开, 脚掌先接触地面(Hunt et al, 1996)。

对灵长类肌肉骨骼系统的完全认识必须依赖于一定数量的灵长类位置行为数据, 这样才能将行为学和解剖学联系起来(Tuttle, 1969; Stern & Oxnard, 1973; Jenkins & Fleagle, 1975; Fleagle, 1979; Rodman, 1979)。但是, 位置行为的数据必须是详细明确且定量的, 需要收集有关灵长类在其自然栖息地的自然表现。所以, 位置行为的分类至关重要(Hunt et al, 1996)。虽然不同物种的位置行为各有其特殊性, 但是一些常见的行为模式是有共性的。在对不同物种的研究中, 我们可参照位置行为的标准化分类体系对该物种的行为模式进行更加详细具体的定义, 从而减少在对灵长类各物种或不同地域相同物种的位置行为比较中的误差。

然而, 也有一些学者认为, 很难建立一套可以囊括并适用于体重相差很大的各个灵长类物种的位置行为学标准体系(如从重 35 g、小鼠般大的狐猴到 180 kg 重的成年雄性大猩猩)(Garber, 2007)。不同物种的四肢和身体比例差异显著。比如有无尾巴、尾巴是否具抓握功能、有无对生的大拇指或无功能的残留拇指等。此外, 历史上原本体型相同的两种灵长类, 在进化过程中体型也会产生显著差异(比如, 一种变大而另一种变小), 也会因异速生长轨迹和不同的身体比例而产生不同的运动方式(Garber, 2007)。所以, 一些重要的位置行为数据可能会在这样的标准分类系统中丢失。

2　影响位置行为的主要因素

影响灵长类位置行为的潜在因素很多。位置行为模式不仅取决于个体发育、体型大小和解剖学特征, 还取决于非生物环境和生物环境的时空差异, 而栖息地的利用是位置行为模式的主要影响因素。

2.1　季节性和具体地点的差异性

研究发现, 在移动中行为模式具有显著的一致性：在进食地点间移动时, 个体可能会重复使用特殊的树栖途径并选择安全有效的支撑物(Gebo & Chapman, 1995a; Crompton, 1984; Dagosto, 1995; McGraw, 1998b; Garber, 1998)。灵长类位置行为在季节性和具体地点两方面具显著差异。形成这种显著差异的主要原因可能是进食、觅食策略以及食物供给和分配的季节性变化(Grand, 1972; Charles-Dominique, 1977; Garber, 1980, 1984; Crompton, 1984; Cant, 1987a; Boinski, 1989; McGraw, 1998a)。

相同种类的灵长类在其栖息地的特殊位置行为, 或者同一位置行为在不同栖息地的使用频率差异, 均与它们对自然生境的适应性有关。Youlatos (2002)和 Mittermeier (1978)分别在法属圭亚那地区和苏里南对两个红脸蜘蛛猴(*Ateles paniscus*)种群进行了研究。其结果体现了蜘蛛猴属两个不同种群位置行为的使用频率对于具体地点的差异性。在这两个地点, 尾臂悬挂最为常见, 而跳跃和桥接最不常见。两地点间最大的不同之处在于攀登/攀爬的频率(在法属圭亚那地区频率为 28.1%, 而在苏里南地区为 17.0%)。而黑掌蜘蛛猴(*Ateles geoffroyi*)位置行为在具体地点间的差异性更为显著。Bergeson(1996)用同一方法在两个不同地点(干燥的热带森林和湿润的热带雨林)对黑掌蜘蛛猴进行研究并发现, 种内在穿越沟壑时位置行为的显著不同表现为：桥接行为在较湿润的森林里明显多于在干燥的森林里, 尾臂悬挂行为明显较少, 而其他形式的位置行为使用频率几乎相同。在 Dagosto (1995)的研究中发现原猴类在不同季节和具体地点间移动时的行为模式十分保守, 而进食时的位置行为则存在很大差异。

2.2　性别差异性

由于雌性和雄性在体重、繁殖所需的营养消耗、社会地位、获取资源方式, 以及成年雄、雌性

所担任的对婴猴照顾和保护角色等方面的不同，一般认为性别产生的位置行为差异性具有显著性。但是，在许多类群的灵长类中雄性与雌性在位置行为上的差异极其细微。例如，就普通黑猩猩来说(*Pan troglodytes*, 雄性比雌性重～30%), Doran (1993)发现，无论是在进食还是移动时，位置行为发生的频率在两性间无显著差异。出现这一现象的部分原因是雌、雄性黑猩猩的主要位置行为均为地面上的四足行走。然而, Doran (1993)也阐述了雌、雄性黑猩猩在树栖进食行为中的差异性，雄性此时的攀爬行为增加，而雌性的四肢移动行为增加。但树栖的进食行为在黑猩猩所有的位置行为中只占到2.2%。因此，黑猩猩因性别而产生的位置行为差异微小。

Cant (1987b)在对苏门答腊猩猩雌、雄两性的位置行为进行的研究发现，雄性相比雌性更趋向于利用较大的支持物，雌性则出现更多的悬挂行为，而在进食中雄性则表现较多的坐和站立行为。猩猩是最大的树栖哺乳动物，且雄性和雌性的体重相差很大(雄性的体重几乎是雌性的2.2倍)，其位置行为的差异也可能与其体重有关。Gebo & Chapman (1995b)在研究树栖猕猴时发现，雌性和雄性在姿势行为和移动行为以及对支持物的使用(尺寸和方向)等方面几乎没有差异，即使在高度二型(因性别不同而在体型方面具有很大差异)的种类中也是如此。他们将这一现象总结为，不论是种间还是种内，身体尺寸的大小与位置行为的频率变化并无紧密联系(Gebo & Chapman, 1995b)。

将猿类和旧大陆猴的研究数据一并考虑，研究者发现雌、雄两性在移动行为、姿势行为和对支持物的使用等方面无显著差异(Gebo, 1992; Gebo & Chapman, 1995b)。该结果支持灵长类物种(至少在成年群体中)位置行为模式高度保守的观点。

从目前的研究结果来看，位置行为的性别差异在大多数灵长类物种中并不显著。然而也有研究发现有些物种存在位置行为的性别差异，且该差异似乎更多的与社交关系和社群角色有关。比如，Chatani (2003)发现成年雌、雄日本猴(*Macaca fuscata*)个体在觅食过程中的姿态行为存在差异，且认为这些差异与其在形态、食物选择、社会活动以及育幼行为中的投入有关。

2.3 年龄差异性

许多灵长类动物的行为模式随个体发育而变化 (Garber, 2007; Prates & Bicca-Marques, 2008)。研究表明，体型大小、动作技能和生理状态的两性差异以及个体发育是导致个体行为差异的重要因素(Dunbar & Badam, 1998; Chatani, 2003; Prates & Bicca-Marques, 2008)。并且，个体行为模式在不同发育阶段也表现明显差异。Dunbar & Badam (1998)在对帽猴（*M. Radiata*)和长尾叶猴（*Presbytis entellus*)不同发育阶段的个体行为模式的比较研究中发现，少年时期的姿势和移动行为最为丰富。其他研究则表明四足行走频率随年龄增加而增加，而跳跃频率则相应减少(Bezanson, 2006; Prates & Bicca-Marques, 2008)。

Li et al (2012)对半野生猕猴位置行为的性别年龄差异的研究表明，猕猴在活动高度、移动行为等方面存在年龄差异性，但无明显的性别差异。主要表现为：成年个体在地面活动的时间明显多于亚成年个体；亚成年个体和少年个体在较高位置活动的时间明显多于成年个体。即成年个体更偏好于在地面活动，而亚成年个体和少年个体则花费更多的时间在树上活动。在移动时，成年个体更多采用四足行走的移动模式，而亚成年个体则更倾向于采用跳跃和架桥等移动模式。

灵长类动物姿势和移动行为的年龄差异性可能与不同年龄阶段个体的体型、力量、协调性、技能和活动水平差异相关(Prates & Bicca-Marques, 2008)。

2.4 其他因素

对于陆地或树栖生活的生物，环境对其体重、四肢和身体比例的影响密切，许多灵长类在世系进化中形成了各自独特的适应性行为模式。研究表明，原猴类和猿类的位置行为和支持物使用模式与其各自的体重、觅食策略以及形态方面的适应性紧密相关(Fleagle & Mittermeir, 1980)。这就需要重新评估以体重为主要影响因素所预测的树栖环境下的位置行为和食物资源利用模式。表1为生理因素、生态因素及社会结构等方面对物种种内位置行为多样性的影响 (Garber, 2007)。

3 位置行为的发生及发展

Dunbar & Badam (1998)对恒河猴 *Rhesus macaque*)、帽猴(*Bonnet macaque*)、长尾叶猴(*hanuman langur*)进行了研究，描述了姿势和移动行为的发展。他们将行为按照婴猴1期、婴猴2期、青少年猴、成年猴、和老年猴的年龄组进行了讨论

表 1　影响种内位置行为模式多样性的因素
Tab. 1　Factors influencing intraspecific variability of positional behavior patterns

生理因素 Physiological factors	生态因素 Ecological factors	社交及行为影响 Social and behavioral factors
体重及新陈代谢速率 Body mass and Metabolic rate	树冠的空间结构 Three dimensional structure of arboreal canopy	种群大小 Group size
两性异形 Sexual dimorphism	栖息地类型 Forest type	食物竞争 Feeding competition
位置行为的能量消耗 Energetic cost of positional behaviors	支撑物类型与食物供给分配的空间关系 Spatial relationship between support	亚群的类型及社群间隔 Patterns of subgrouping and social spacing
个体发育时体重以及四肢和身体比例的改变 Ontogenetic changes in body weight and limb and body proportions	食物供给分配的季节性变化 Seasonal changes in food available and distribution	种群角色和行为模式的不同 Differences in social role and activity pattern
繁殖条件 Reproductive condition	栖息地模式的性别年龄差异 Age or sex based differences in patterns of habitat utilization	等级 Dominance
营养需求 Nutritional requirements	对掠食者的躲避 Predator avoidance	联盟关系或亲属关系 Affiliative bonds and kinship
温度调节 Thermoregulation		行为的个体特异性和年龄及性别方面的不同 Idiosyncratic, age, and sex-based differences in behavior

(表 2)。婴猴 1 期用手脚强有力地抓握依附在母猴腹部。独立的协调运动行为发展于婴猴 2 期。青少年时期位置行为的定性、定量发展达到最高水平。成年期和老年期运动能力的多样性及质量逐步下降。但是，猕猴和叶猴的行为发展过程有所不同。这些发现对神经机制的概念产生了影响，表明这些机制的发展可能存在物种差异性。

三个物种的新生婴猴均不能独立行走、站立或

表 2　不同灵长类物种年龄组划分
Tab. 2　Approximate chronological ages for groups in each species

年龄组 Age group	恒河猴 *Macaca mulatta*	帽猴 *Macaca radiata*	长尾叶猴 *Presbytis entellus*
婴猴 1 期 Infant-1	0～2 个月 0~2 months	0～2 个月 0~2 months	0～3 或 5 个月 0~3 or 5 months
婴猴 2 期 Infant-2	2～12 个月 2~12 months	2～12 个月 2~12 months	3 或 5 个月～15 个月 3 or 5~15 months
青少年猴 Juvenile	1～3 或 4 岁 1~3 or 4 years	1～3 或 4 岁 1~3 or 4 years	15 个月～4 岁 15 months~4 years
成年猴 Adult	3 或 4～15 岁 3 or 4~15 years	3 或 4～15 岁 3 or 4~15 years	4～15 岁 4~15 years
老年猴 Elderly	15～20 岁及以上 15~20+ years	15～20 岁及以上 15~20+ years	15～20 岁及以上 15~20+ years

端坐。在婴猴 1 期的后期开始出现一些短暂的移动行为(如，四足行走、双足跳跃)，但肢体运动显著不协调，并且在节平面(pitch plane)头部会过度旋转或上下摆动。处于婴猴 2 期的恒河猴、帽猴，和婴猴 2 期后期的长尾叶猴已经出现了大多数成年猴的基本姿势和移动行为。独立姿势和移动行为的出现是婴猴 1 期到婴猴 2 期过渡的一项行为指标。虽然在这段时间内婴猴的动作越来越独立，但它们与其母亲的距离仍然保持在 1 m 范围内。最初其动作显得相对笨拙和不协调，表现在：婴猴经常会绊倒、踩空或失去平衡(特别是在树上)。皮质神经连接(corticomotoneuronal connections)在出生后第三个月末就已经全面建立了，这使得婴猴 2 期个体能够精确顺利地释放抓握物品，以及进行相对独立的手指动作(relatively independent finger movements, RIFM)(Lawrence & Hopkin, 1976)，其行为也越来越细化。在这三个灵长类物种中，青少年时期是位置行为发展的黄金时期。与成年猴相比较灵活的体型与已近乎完善的力量和协调性相结合(Dunbar, 1994)，使得青少年猴能完全利用陆地和树木资源进行觅食、玩耍和移动。青少年时期的主要特征是其位置行为大多发生在小型树枝末端(Dunbar, 1989)。在树枝上的姿势行为包括仰卧、俯卧、2～4 只前后肢站立；在树枝下的悬挂行为包括头向上的前肢悬挂和头可伸向各方向的前后肢悬挂。青少年猴在地面和较大直径的树枝上的行走步态通常为对角线行走，而当作为支撑物的树枝直径逐渐减小时，青少年猴就会转变为非对称步态行走(YD1-b)，从而减少其失去平衡而从树枝上掉下的可能性(Gray, 1944)。青少年猴在树木上的奔跑也仅限于在较大直径的树枝上。除了在玩耍外(这时它们常常会扭转四肢)，青少年猴在飞跃过程中身体是十分僵硬的(Dunbar, 1989)，为了减少受伤的危险，整个身体的扭转被控制在最少(Dunbar, 1988, 1994)。Napier & Walker (1967)首先在原猴类中观察到垂直依附型飞跃，研究人员随后对其进行了生物力学分析(Dunbar, 1988, 1994; Peters & Preuschoft, 1984)。结果表明，这是青少年猴(和较年长的婴猴 2 期猴)进行的运动学上非常复杂的一种跳跃方式，并且在成年猴中尚未发现。这些随年龄增长而出现的行为变化可能更多地与身体比例的变化和重量分布有关，而非受神经系统控制(Dunbar, 1994)。成年猴与青少年猴相比，其姿势和移动行为总数减少，而不是如

人们一般所认为的增多。减少最多的行为是青少年猴在小树枝上的玩耍行为, 并且在树枝下进行的姿势和移动行为均消失。成年长尾叶猴常常会做出一些惊人并多样的树木间跳跃(Rosenblum, 1968)。相反, 成年猕猴只会在必要时偶尔小心翼翼地进行一些简单的短距离跳跃。对于这 3 个物种来说, 成年猴在陆地上的移动行为包括：行走、奔跑和跳跃(Grand, 1976)。与在青少年猴中的观察相同(Dunbar & Badam, 1995), 不同的移动行为模式会有不同的头部和躯干的动作。在行走时, 头可在躯干上转动, 而在急速奔跑和跳跃式时, 躯干会绕头部而转动。老年猴的位置行为模式相对成年猴减少, 且存在本质上的区别。老年猴往往坐和躺的动作较多而不常移动 (Rawlins, 1976), 尽可能的避免奔跑、跳跃和攀爬, 且在树枝上的姿势和移动行为也仅限于最大的树枝。这些行为上的限制主要反映了机械力学的变化和衰退(如关节机动性的限制, 骨骼的退化以及视力调节的丧失)(Derousseau et al, 1986; Turnquist, 1986; Pyykkö et al, 1988), 而非神经系统的变化。

目前对于其他灵长类物种位置行为的发生与发展尚未有全面系统的研究。此方面的研究对于认识灵长类进化史有一定的意义, 并有助于进行物种划分及辨别。

4 结 语

目前, 灵长类位置行为的研究主要关注于姿势行为和移动行为的区分、位置行为分类的定义、以及灵长类尾巴是起到平衡还是重力支持作用的区分、体型大小对支持点的偏好性选择和对位置行为的影响、以及季节性和具体地点、不同性别年龄组的位置行为的差异性等。

Hunt et al 对位置行为的标准化定义已近乎全面, 但由于栖息地的潜在变化和灵长类的物种多样性, 可能还会不断有新的位置行为模式被发现并记录。在对非人灵长类动物位置行为的研究更加成熟之后, 还可比较非人灵长类和人类之间的姿势和运动行为发生和发展的异同。对于具体野生个体的位置行为研究还受限于个体识别, 尤其是青少年猴及亚成年猴, 它们一般难以进行个体区分, 并且其位置行为十分多样, 数据记录也有一定的困难。随着科技水平的进步和对野生猴群的研究深入以及国内外学者们对位置行为研究的关注, 位置行为的研究将会有进一步的发展。

中国是全球少数几个灵长类动物资源最丰富的国家之一, 在现存的 200 余种灵长类动物中, 中国分布有 3 科(懒猴科、猴科、长臂猿科)20 余种、40～47 个亚种, 主要包括蜂猴属、猕猴属、长尾叶猴属、乌叶猴属、仰鼻猴属、长臂猿属等。其中川金丝猴(*Rhinopithecus roxellanae*)、滇金丝猴(*Rhinopithecus bieti*)、黔金丝猴(*Rhinopithecus brelichi*)、藏酋猴(*Macaca thibetana*)及台湾猴为我国特有种。黑长臂猿(*Hylobates concolor*)、白掌长臂猿(*Hylobates lar*)、白眉长臂猿(*Hylobates hoolock*)及海南长臂猿等至少 14 个亚种濒临灭绝(Pan & Kun, 1984), 而白臀叶猴(*Pygathris nemaeus*)已在我国绝迹(或有争议)。不同物种根据生态位的不同进化出适应不同生境的位置行为模式。目前我国灵长类研究主要涉及的领域为生态学、遗传学、生理学、医学、社会行为学等方面, 而野生灵长类位置行为的研究近乎空白。然而此方面的研究对于理解灵长类适应性的多样化、灵长类生态学、解剖学以及灵长类的进化史十分必要, 并将对中国灵长类动物资源的保护产生重要意义。

致谢：美国伊利诺伊斯州立大学 Paul A. Garber 教授, 西北大学朱文文、黄康、张东、付卫玮、张红阳、吴林林、李娟娟、侯立、王荣涛、侯荣诸君在本文执笔和文献查阅中给予无私帮助, 在此谨致衷心感谢。

参考文献：

Anemone RL. 1993. The function anatomy of the hip and thigh in primates [C] // Gebo DL. Postcranial Adaptation in Nonhuman Primates. Dekalb: Northern Illinois University Press, 150-174.

Bergeson DJ. 1996. The Positional Behavior and Prehensile Tail Use of *Alouatta palliate*, *Ateles geoffroyi*, and *Cebus capucinus* [D]. Ph.D. Dissertation, Washington University, St. Louis, Missouri.

Bergeson DJ. 1998. Patterns of suspensory feeding in *Alouatta palliata*, *Ateles geoffroyi*, and *Cebus capucinus* [C] // Strasser E, Fleagle JG, Rosenberger A, McHenry H. Primate Locomotion: Recent Advances. New York: Plenum Press, 45-60.

Bezanson MF. 2006. Leap, bridge, or ride? Ontogenetic influences on positional behavior in *Cebus* and *Alouatta* [C] // Estrada A, Garber PA, Pavelka MSM, Luecke L. New Perspectives in the Study of Mesoamerican Primates: Distribution, Ecology, Behavior, and

Conservation. New York: Springer Verlang, 333-348.

Boinski S. 1989. The positional behavior and substrate use of squirrel monkeys: Ecological implications [J]. *J Hum Evol,* 18(7): 659-677.

Cant JGH. 1986. Locomotion and feeding posture of spider and howling monkeys: field study and evolutionary interpretation [J]. *Folia Primatol,* 46(1): 1-14.

Cant JGH. 1987a. Positional behavior of female bornean orangutans (*Pongo pygmaeus*) [J]. *Am J Primatol,* 12(1): 71-90.

Cant JGH. 1987b. Effects of sexual dimorphism in body size on feeding postural behavior of Sumatran orangutans (*Pongo pygmaeus*) [J]. *Am J Phys Anthropol,* 74(2): 143-148.

Charles-Dominique P. 1977. Ecology and Behavior of Nocturnal Primates [M]. New York: Columbia University Press.

Chatani K. 2003. Positional behavior of free-ranging Japanese macaques (*Macaca fuscata*) [J]. *Primates,* 44(1): 13-23.

Crompton RH. 1984. Foraging, habitat structure, and locomotion in two species of Galago [C] // Rodman PS, Cant JGH. Adaptations for Foraging in Nonhuman Primates. New York: Columbia University Press, 73-111.

Dagosto M. 1995. Seasonal variation in positional behavior of Malagasy lemurs [J]. *Int J Primatol,* 16(5): 807-834.

Derousseau CJ, Bito LZ, Kaufman PL. 1986. Age-dependent impairments of the rhesus monkey visual and musculoskeletal systems and apparent behavioral consequences [C] // Rawlins RG, Kessler MJ. The Cayo *Santiago Macaques*. Albany: State University of New York Press, 233-251.

Doran DM. 1993. Sex differences in adult chimpanzee positional behavior: the influence of body size on locomotion and posture [J]. *Am J Primatol,* 91(1): 99-116.

Dunbar DC, Badam GL. 1995. Head and trunk stabilization in natural gaits of free-ranging monkeys [J]. *Soc Neurosci Abstr,* 21: 418.

Dunbar DC, Badam GL. 1998. Development of posture and locomotion in free-ranging primates [J]. *Neurosci Biobehav Rev,* 22(4): 541-546. Dunbar DC. 1988. Aerial maneuvers of leaping lemurs: the physics of whole-body rotations while airborne [J]. *Am J Primatol,* 16(4): 291-303.

Dunbar DC. 1989. Locomotor behavior of rhesus macaques (*Macaca mulatta*) on Cayo Santiago [J]. *P R Health Sci J,* 8(1): 79-85.

Dunbar DC. 1994. The influence of segmental movements and design on whole-body rotations during the airborne phase of primate leaps [J]. *Z Morphol Anthropol,* 80(1): 109-124.

Fleagle JG. 1978. Locomotion, posture and habitat utilization in two sympatric Malayan leaf monkeys [C] // Montogomery GE. Ecology of Arboreal Folivores. Washington DC: Smithsonian Press, 243-251.

Fleagle JG. 1979. Primate positional behavior and anatomy: naturalistic and experimental approaches [C] // Morbeck ME, Preuschoft H, Gomberg N. Environment, Behavior and Morphology: Dynamic Interactions in Primates. New York: Gustav Fischer Verlag, 313-325.

Fleagle JG, Mittermeier RA. 1980. Locomotor behavior, body size, and comparative ecology of seven Surinam monkeys [J]. *Am J Phys Anthropol,* 52(3): 301-314.

Fontaine R. 1990. Positional behavior in *Saimiri boliviensis* and *Ateles geoffroyi* [J]. *Amer J Phys Anthropol,* 82(4): 485-508.

Garber PA. 1980. Locomotor behavior and feeding ecology of the Panamanian tamarin (*Saguinus oedipus geoffroyi*, Callitrichidae, Primates) [J]. *Int J Primatol,* 1(2): 185-210.

Garber PA. 1984. Use of habitat and positional behavior in a neotropical primates, *Saguinus Oedipus* [C] // Rodman PS, Cant JGH. Adaptations for Foraging in Nonhuman Primates: Contributions to an Organismal Biology of Prosimians, Monkeys, and Apes. New York: Columbia University Press, 112-133.

Garber PA. 1992. Vertical clinging, small body size, and the evolution of feeding adaptation in the Callitrichinae [J]. *Am J Phys Anthropol,* 88(4): 469-482.

Garber PA. 1998. Within- and between-site variability in moustached tamarin (*Saguinus mystax*) positional behavior during food procurement [C] // Strasser E, Fleagle JG, Rosenberger A, McHenry H. Primate Locomotion: Recent Advances. New York: Plenum Press, 61-78.

Garber PA. 2007. Primate locomotor behavior and ecology [C] // Campbell CJ, Fuentes A, MacKinnon KC, Panger M, Bearder SK. Primates in Perspective. New York: Oxford University Press, 543-560.

Gebo DL, Chapman CA. 1995a. Positional behavior in five sympatric old world monkeys [J]. *Am J Phys Anthropol,* 97(1): 49-76.

Gebo DL, Chapman CA. 1995b. Habitat, annual, and seasonal effects on positional behavior in red colobus monkeys [J]. *Am J Phys Anthropol,* 96(1): 73-82.

Grand TI. 1972. A mechanical interpretation of terminal branch feeding [J]. *J Mammal,* 53(1): 198-201.

Grand TI. 1976. Differences in terrestrial velocity in *Macaca* and *Presbytis* [J]. *Am J Phys Anthropol,* 45(1): 101-108.

Gray J. 1944. Studies in the mechanics of the tetrapod skeleton [J]. *J Exp Biol,* 20(2): 88-116.

Hunt KD, Cant JGH, Gebo DL, Rose MD, Walker SE, Youlatos D. 1996. Standardized descriptions of primate locomotor and postural modes [J]. *Primates,* 37(4): 363-387.

Hunt KD. 1991. Positional behavior in the Hominoidea [J]. *Int J Primatol,* 12(2): 95-118.

Jenkins FA Jr, Fleagle JG. 1975. Knuckle-walking and the functional anatomy of the wrists in living apes [C] // Tuttle RH. The Functional and Evolutionary Biology of Primates. Chicago: Aldine, 213-228.

Jiang ZG. 2004. Theories in Animal Behavioral Study and Conservation Methods [M]. Beijing: Science Press. [蒋志刚. 2004. 动物行为原理与物种保护方法. 北京：科学出版社.]

Kinzey WG. 1967. Preface [J]. *Am J Phys Anthropol,* 26(2): 115-118.

Lawrence DG, Hopkins DA. 1976. The development of motor control in the rhesus monkey: evidence concerning the role of corticomotoneuronal connections [J]. *Brain,* 99(2): 235-254.

Li DY, Zhou QH, Tang HX, Huang CM. 2012. Sex-age differences in activity budget and position behavior of rhesus macaques (*Macaca mulatta*) [J]. *Acta Ther Sin,* 32(1): 25-32. [黎大勇, 周岐海, 唐兴华, 黄乘明. 2012. 猕猴不同性别年龄组个体时间分配和姿态行为的差异分析. 兽类学报, 32(1): 25-32.]

McGraw WS. 1998a. Posture and support use of Old World monkeys (Cercopithecidae): the influence of foraging strategies, activity patterns, and the spatial distribution of preferred food items [J]. *Am J Primatol,* 46(3): 229-250.

McGraw WS. 1998b. Locomotion, support use, maintenance activities, and habitat structure: the case of the Ta ï Forest cercopithecids [C] // Strasser E, Fleagle JG, Rosenberger A, McHenry H. Primate Locomotion: Recent Advances. New York: Plenum Press, 79-94.

Mittermeier RA. 1978. Locomotion and posture in *Ateles geoffroyi* and

Ateles paniscus [J]. *Folia Primatol*, 30(3): 161-193.

Napier JR, Walker AC. 1967. Vertical clinging and leaping-a newly recognized category of locomotor behaviour of primates [J]. *Folia Primatol,* 6(3-4): 204-219.

Niemitz C. 1984. Locomotion and posture of *Tarsius bancanus* [C] // Niemitz C. Biology of Tarsiers. New York: Gustav Fischer Verlag, 191-226.

Oxnard CE, Crompton RH, Liebermann SS. 1990. Animal Lifestyles and Anatomies: The Case of the Prosimian Primates [M]. Seattle: Washington University Press.

Pan QH, Ben KL. 1984. The review and prospect of primatology in China [J]. *Zool Res,* 5(S4): 1-6. [潘清华, 贲昆龙. 1984. 中国灵长类研究工作的回顾与展望. 动物学研究, 5(S4): 1-6.]

Peters A, Preuschoft H. 1984. External biomechanics of leaping in Tarsius and its morphological and kinematic consequences [C] // Niemitz C. Biology of Tarsiers. New York: Gustav Fischer Verlag, 227-255.

Prates HM, Bicca-Marques JC. 2008. Age-sex analysis of activity budget, diet, and positional behavior in *Alouatta caraya* in an orchard forest [J]. *Int J Primatol,* 29(3): 703-705.

Prost JH. 1965. A definitional system for the classification of primate locomotion [J]. *Am Anthropol,* 67(5): 1198-1214.

Pyykkö I, Jäntti P, Aalto H. 1988. Postural control in the oldest olds [J]. *Adv Otorhinolaryngol,* 41: 146-151.

Rawlins RG. 1976. Locomotor ontogeny in *Macaca mulatta*: I. Behavioral strategies and tactics [J]. *Am J Phys Anthropol,* 44: 201.

Ripley S. 1967. The leaping of langurs: a problem in the study of locomotor adaptation [J]. *Am J Phys Anthropol,* 26(2): 149-170.

Rodman PS. 1979. Skeletal differentiation of *Macaca fascicularis* and *Macaca nemestrina* in relation to arboreal and terrestrial quadrupedalism [J]. *Am J Phys Anthropol,* 51(1): 51-62.

Rosenblum LA. 1986. Mother-infant relations and early behavioral development in the squirrel monkey [C] // Rosenblum L, Cooper R. The *Squirrel Monkey*. New York: Academic Press, 207-233.

Stern JT Jr, Oxnard CE. 1973. Primate locomotion: some links with evolution and morphology [J]. *Primatologia,* 4(11): 1-93.

Turnquist JE. 1986. Joint mobility as a function of age in free-ranging rhesus monkeys (*Macaca mulatta*) [C] // Rawlins RG, Kessler MJ. The Cayo Santiago Macaques. Albany: State University of New York Press, 253-262.

Tuttle RH. 1969. Quantitative and functional studies on the hands of the anthropoidea. I: the Hominoidea [J]. *J Morphol,* 128(3): 309-363.

Youlatos D. 2002. Positional behavior of black spider monkeys (*Ateles paniscus*) in French Guiana [J]. *Int J Primatol,* 23(5): 1071-1093.

~~~~~~

秦岭川金丝猴研究中心简介

该团队自2000年来，在国家自然科学基金的持续资助下，对秦岭川金丝猴进行了长期而深入的研究。取得以下重要成果：1）经过对秦岭川金丝猴种群的分布和数量的系统调查，结合对400年来中国金丝猴群分布变迁的分析，揭示了秦岭成为它们最后的避难所，并且仍受到生境破碎化的威胁。2）对秦岭川金丝猴的栖息地选择、家域利用、食性和种群参数进行了综合研究，揭示了它们泛化的食性、大的家域特征，阐明了这类本应在热带亚热带生存的叶猴种类对寒温带气候的适应机制。3）在研究交配选择和个体扩散机制的基础上，首次发现这个物种的交配制度是混交制。提出了在破碎化生境斑块间建立走廊带，使得孤立种群间个体得以沟通，恢复基因交流，解决了种群隔离面临的实际保护问题。4）通过"招引性投食"的方法，使得树栖灵长类可以被近距离观察并获得成功，实现了"个体识别"，满足了个体行为和社会关系定量分析的条件，为我国灵长类动物与大型哺乳动物的行为学研究提供了可借鉴的示范样板。5）运用个体识别的手段，对野生种群的个体行为和社会关系进行系统研究，发现这种大型的社群具有分层的社会结构和严密的组织形式，阐明了它们的社会结构、等级制度、交配选择和行为发育过程，初步揭开了川金丝猴社会体系的神秘面纱——一夫多妻制的松散母系社会。推动了中国灵长类行为生态学研究的发展。6）建立了"中国第一个金丝猴野外研究基地"，为野生动物种群的长期监测和保护研究开创了新的道路。该团队曾得到5 项国家自然科学基金资助。发表相关论文百余篇，其中SCI 收录近50篇。国际灵长类学会主办的*International Journal of Primatology*和美国灵长类学会主办的*American Journal of Primatology*代表国际灵长类研究的最高水平，国际保护生物学会主办的*Conservation Biology*代表着国际保护生物学研究的最前沿。该团队在这三大国际刊物上发表了相关论文 10 余篇。其的研究成果得到了国内外学术界的广泛关注与好评，在世界范围为我国的灵长类研究赢得了一席之地。

西北大学生命科学学院 秦岭川金丝猴研究中心（陕西 西安 710069）
~~~~~~

动 物 学 研 究 2012，Oct. 33(5): 523−526　　CN 53-1040/Q　ISSN 0254-5853
Zoological Research　　DOI：10.3724/SP.J.1141.2012.05523

Cathelicidins 家族抗菌肽研究进展

广慧娟[1]，厉　政[1]，王义鹏[2]，赖　仞[3]，于海宁[1,*]

(1. 大连理工大学 生命科学与技术学院，辽宁 大连　116024；2. 中国科学院烟台海岸带研究所 生物资源实验室，山东 烟台　264003；
3. 中国科学院和云南省动物模型与人类疾病机理重点实验室，中国科学院昆明动物研究所，云南 昆明　650223)

摘要：Cathelicidins 是一类具有广谱抗微生物活性的多功能抗菌肽。迄今为止，在几乎所有种类的脊椎动物体内均有发现，在动物先天免疫系统中发挥极其重要的作用。Cathelicidins 不仅对普通革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌、真菌以及病毒具有非常强的抗性，而且对许多临床分离耐药菌株同样具有作用。Cathelicidins 具有特殊的杀菌机理，不易产生耐药性。此外，cathelicidins 结构简单，溶血活性和细胞毒性小，因此极具开发潜力。该文主要对 cathelicidins 的结构与分类、生物活性与功能、作用特点与机制及其在医药领域中的应用前景和存在问题进行了综述。

关键词：Cathelicidins；结构与功能；抗菌活性；耐药菌株
中图分类号：Q514.3; R96　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：0254-5853-(2012)05-0523-04

Progress in cathelicidins antimicrobial peptides research

GUANG Hui-Juan[1], LI Zheng[1], WANG Yi-Peng[2], LAI Ren[3], YU Hai-Ning[1,*]

(1. *School of Life Science and Biotechnology*, *Dalian University of Technology*, *Dalian* 116024; 2. *Biological Resources Laboratory*, *Yantai Institute of Coastal Zone Research*, *the Chinese Academy of Sciences*, *Yantai* 264003, *China*; 3. *Key Laboratory of Animal Models and Human Diseases Mechanisms of the Chinese Academy of Sciences and Yunnan Province*, *Kunming Institute of Zoology*, *the Chinese Academy of Sciences*, *Kunming* 650223, *China*)

Abstract: Cathelicidins are a family of multi-functional antimicrobial peptides found in almost all types of vertebrates, where they play vital roles in the immune system. As they possess broad-spectrum antimicrobial properties, cathelicidins are not only strongly resistant to Gram-positive and Gram-negative bacteria, fungi, and viruses, but they are also active against many antibiotic-resistant clinical bacteria, adopting a special antimicrobial mechanism that is unlikely to lead to microbial resistance. Cathelicidins likewise possess simple structures, and low hemolytic and cytotoxic activities. Collectively, these features suggest potentially novel and exciting prospects for cathelicidins' application in medicine. Here, we review the structures, classification, activities, mechanisms, as well as prospective developments in the usage and application of cathelicidin antimicrobial peptides.

Key words: Cathelicidins; Structure and function; Antimicrobial activity; Resistant strains

近几十年，由于抗生素的滥用导致的多药耐药菌感染已经成为当代临床医学中急需解决的重大难题。近来仅有三类新型抗生素(脂肽类、恶唑烷酮类和链阳性菌素类)上市，且均用于治疗 G^+菌感染。2010 年，美国 FDA 仅批准了用于治疗急性细菌性皮肤和皮肤结构感染(ABSSSI)及社区获得性细菌性肺炎(CABP)的头孢菌素类抗菌药——ceftaroline fosamil 注射剂。因此，开发新型抗菌药物迫在眉睫。而抗菌肽作为一种生物来源的、核糖体合成的天然小分子多肽，在新型抗菌药物开发领域所具有的潜在优势已毋庸置疑(Hancock & Sahl, 2006)。它们具有广谱的抗菌活性，对许多 G^+菌和 G^-菌，以及真菌，甚至病毒都有活性。此外，由于它们的作用靶点主要位于微生物的细胞膜上，通过诱导微生物细胞膜去极化，微生物细胞破裂而发挥作用，因此，不易引起微生物抗性。而 cathelicidins 家族抗菌肽作为脊椎动物来源的一个重要的抗菌肽家族，具有更加广谱高效的抗微生物活性、低溶血活性以及细胞毒性，在新型抗菌药物开发领域显示出巨大的潜力。

收稿日期：2012-03-05；接受日期：2012-08-15
基金项目：国家自然科学基金资助项目(41076098)
[*]通信作者(Corresponding author)，E-mail: joannyu@live.cn

1 Cathelicidins 家族抗菌肽的一般特点

1.1 Cathelicidins 抗菌肽的结构和分类

Cathelicidins 的前体由 N-端信号肽区域(29~30 个氨基酸残基，AA)、保守的中间 cathelin 区域(94~114 个 AA)和高度特异的 C-末端成熟肽区域(12~100 个 AA)构成。Cathelin 区域的相对分子质量大约为 11000, 末端具有 4 个位置极度保守的 Cys 残基, 形成两对二硫键(C85~C96 和 C107~C124), 可能具有稳定 cathelicidins 分子结构的作用(Sanchez et al, 2002)。Cathelin 区域富含带负电的 Asp 和 Glu 残基, 可能在前体肽的胞内运输和储存过程中能够中和C-末端带正电的成熟肽片段, 使前体保持无活性状态, 从而避免对自身细胞的毒害(Boman et al, 1994)。

按照二级结构可以大体分为四大类: α-螺旋 cathelicidins、延伸-螺旋 cathelicidins、环状 cathelicidins 和 β-片层 cathelicidins。α-螺旋 cathelicidins: 来源于哺乳动物的 cathelicidins 抗菌肽大都属于 α-螺旋构型, 且一级结构一般只含有 23~40 个 AA。它们在水溶液中大多是松散结构, 但是当与生物膜的相互接触时会折叠成两亲性的螺旋结构(Turner et al, 1998; Tack et al, 2002)。目前, 人、小鼠、兔、羊、牛、猪、马、驴、鸡、狗、猫和金环蛇等许多物种中发现的 cathelicidins 均属于 α-螺旋型, 如 LL-37 (Agerberth et al, 1995)、BMAP-27、CAP-18、Pc-CATHs (Wang et al, 2011)、Cc-CATHs (Feng et al, 2011)、K9CATH、feCath 和 cathelicidin-BF (Wang et al, 2008)等。延伸-螺旋 cathelicidins, 如 indolicidin 和富含 Pro 的抗菌肽类, 因含有特殊的氨基酸组成, 不易形成 α-螺旋构型, 而折叠成了更细长的结构。包括牛的 Bac4、5、7 和 indolicidin (Scocchi et al, 1998), 来源于山羊的 Bac5, 猪的 prophenin-1、2 和 PR-39 (Pungerčar et al, 1993)等。

此外还有环状cathelicidins, 牛嗜中性白细胞中分离出的 dodecapeptide 和从绵羊骨髓细胞克隆的同系物肽 *Ovis. aires* dodecapeptide (OaDode)。β-片层 cathelicidins, 代表是来源于猪白细胞的 protegrins (PG1~5), 含有 16~18 个 AA, 它们通过二硫键的稳定折叠成发卡结构。PG-1 的 NMR 谱表明其结构是由一段β-转角连接的两段反向平行β-片层结构, 形成中心的疏水区和两端亲水区的两亲性结构(Kokryakov et al, 1993)。

2 Cathelicidins 家族抗菌肽的活性与功能

2.1 Cathelicidins 家族抗菌肽的抗微生物活性

2.1.1 α-螺旋 cathelicidins α-螺旋 cathelicidins 抗菌肽对 G^+和 G^-菌均具有抗菌活性, 而且包括一些耐药性临床分离细菌, 如耐甲氧西林金黄色葡萄球菌、耐万古霉素粪肠球菌和多重耐药的铜绿假单孢杆菌(Turner et al, 1998; Skerlavaj et al, 1996)。与人 α-defensin 相比, LL-37 对包括铜绿假单孢杆菌和嗜麦芽窄食单孢菌在内的许多细菌的抗菌活性更强(Turner et al, 1998)。小鼠腹腔注射 SMAP-29、BMAP-27 及 BMAP-28 0.2～0. 8 mg/kg, 能够完全保护由铜绿假单胞杆菌、金黄色葡萄球菌或大肠埃希氏菌感染的腹膜炎小鼠, 而对照组小鼠死亡率超过 90%(Mangoni et al, 1997)。来源于犬的 K9CATH, 对淋病奈瑟菌的抗菌能力比之前所发现其它 cathelicidin 家族抗菌肽高出 4~8 倍, 其 C 端高极性的 7 个氨基酸残基可能导致病原微生物的降解并确保内毒素的安全释放(Sang et al, 2007)。金环蛇来源的 cathelicidin-BF 对多重耐药铜绿假单孢杆菌、多重耐药肺炎克雷伯菌 08040724、耐药大肠杆菌和甲型副伤寒沙门氏菌的 MIC 值分别为 2.3 μg/ml、0.3 μg/ml、0.6 μg/ml 和 1.2 μg/ml(Wang et al, 2008)。相较哺乳动物来源的 α-螺旋 cathelicidins, 鸟类 cathelicidins 抗菌肽活性似乎更强。我们前期从环颈雉体内发现的 Pc-CATHs, 即使在 100 mM NaCl 的条件下, 也展示出比氨苄青霉素、卡那霉素和人 LL-37 更强的抗菌能力, Pc-CATHs 对大多数金黄色葡萄球菌的MIC低于1.48 μM, 而后三者在2 mg/ml 浓度下检测不到抗菌活性。而且这种盐依赖的特性也为治疗囊胞性纤维症和克罗恩病提供更多的选择(Wang et al, 2011)。而我们从鹌鹑体内发现的 Cc-CATHs, 虽然其抗菌活性略弱于鸡 fowlicidin-1 和 Pc-CATH1, 但却具有极低的溶血性和细胞毒性(Feng et al,2011)。

2.1.2 β-片层 cathelicidins PG 家族成员在体外不仅表现出广谱的抗菌活性, 而且还具有抗 HIV-1 病毒的活性(Tamamura et al, 1995; Qu et al, 1996; Yasin et al, 1996; Lehrer & Ganz, 1996)。在浓度为 1~5 μg/ml 时, PG 家族成员能够杀死大量 G^-菌包括大肠杆菌、铜绿假单孢杆菌、肺炎克雷伯菌、鼠伤寒沙门氏菌以及多种 G^+菌如甲氧西林耐药金黄色葡萄球菌、万古霉素耐药肠球菌和分支结核杆菌。

此外 PG 对真菌和有包膜病毒也具有活性。PG 家族抗菌肽在生理盐浓度溶液中或在血清存在情况下仍具有活性(Lehrer & Ganz, 1996)。

2.1.3　延伸-螺旋 cathelicidins　牛 Bac5 和 Bac7 是高度阳离子化的多肽，体外具有非常强的抗菌活性，在 0.5~20 μM 浓度范围内，能有效杀死大肠杆菌、鼠伤寒沙门氏菌、肺炎克雷伯菌、表皮葡萄球菌和巨大芽孢杆菌(Gennaro et al, 1989)。此外，对螺旋体也具有活性，如钩端螺旋体和双曲螺旋体(Scocchi et al, 1993)。对牛 Bac5 和 Bac7 抗菌机理研究表明，这两种抗菌肽能够迅速增加敏感菌细胞内膜和外膜的通透性，导致细菌的内容物外泄，此外还能抑制细胞呼吸并降低细菌细胞内 ATP 水平。同样源于牛的 indolicidin 抗菌谱非常广，对 G^+菌、G^-菌、真菌，甚至耐药的临床分离株(如铜绿假单胞菌、念珠菌亚种和新型隐球菌的临床分离株) 以及寄生虫都有很强的活性。另外，indolicidin 还具有抗 HIV-1 病毒活性和治疗小鼠系统曲霉病感染的功效。

2.1.4　环状 cathelicidins　天然 dodecapeptide 和 OaDode 对大肠埃希氏菌和金黄色葡萄球菌具有强大的抗菌活性。研究结果表明，当环状 dodecapeptide 分子解环成线性后,它的抗菌活性就从抗 G^-菌转变为抗 G^+菌。环状 dodecapeptide 与脂多糖的结合比线性 dodecapeptide 更有效，更能提高外膜的渗透性(Romeo et al, 1988)。进一步研究表明，环状 dodecapeptide 对鼠和人 T 淋巴细胞、鼠胚胎神经元细胞和星形胶质细胞，以及人成胶质细胞瘤细胞有毒性。

2.2　Cathelicidins 家族抗菌肽的其它生物学功能

Cathelicidins 作为脊椎动物所特有的宿主防御肽，在脊椎动物抵抗外界微生物侵袭的天然免疫反应过程中发挥了重要作用。除此之外，cathelicidins 还具有如细胞趋化、伤口修复、抑制组织损伤、促进血管生成等重要活性(Wuerth & Hancock, 2011)。例如 PR-39 通过抑制炎症反应中吞噬细胞 NADPH 氧化酶活性，直接减少超氧阴离子的产生，从而减轻局部组织的损伤(Shi et al, 1996)，而且 PR-39 诱导小鼠间质细胞表面硫酸类肝素蛋白多糖 syndecan-1 和 syndecan-4 的表达，促进组织损伤的修复(Shi et al, 1996)。另外，LL-37 通过结合并中和角质化细胞中的细胞溶质 DNA，阻断 AIM2(参与驱动炎症的重要物质)炎性体激活，减少牛皮癣炎症对机体的损伤(Dombrowski et al, 2011)。

当机体受到 G^-菌侵袭时，机体与细菌脂多糖 LPS 的相互作用可能会导致对机体有害的系统性反应。体内实验研究表明，cathelicidins 可以结合内毒素，对机体与 LPS 的相互作用具有调节功能(Vandermeer et al, 1995)。此外，cathelicidins 还具有调节适应性免疫的功能，在对小鼠 cathelicidins 相关的抗菌肽研究中第一次证明 cathelicidins 能够在体内转变 T 细胞依赖的体液免疫活性，因此能够调节 B 淋巴细胞和 T 淋巴细胞的活性(Wuerth & Hancock, 2011)。

3　Cathelicidins 家族抗菌肽在医药领域的应用前景和存在问题

Cathelicidins 家族抗菌肽具有广谱的抗微生物活性，对 G^+菌、G^-菌、真菌、霉菌、原虫和部分有包膜病毒均有活性。与其它家族，如 defensins、hepcidins、昆虫抗菌肽和蛙科皮肤来源抗菌肽相比，cathelicidins 家族抗菌肽抗菌活性更强，最小抑菌浓度(MICs)值可以达到几个 μM 水平(Wang et al, 2011; Feng et al, 2011)。此外，cathelicidins 家族抗菌肽杀菌作用迅速，对金环蛇来源的 cathelicidin-BF 杀菌动力学实验表明，其在 1 min 内即可杀死受试细菌，比第三代号称“最强抗生素”的亚胺培南要快的多(Wang et al, 2008)。更重要的是，部分 cathelicidins 家族抗菌肽对大量临床分离耐药菌株，甚至是超级耐药菌，具有非常强的活性，如 LL-37 对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌、耐万古霉素粪肠球菌和多重耐药的铜绿假单孢杆菌均具有极强的杀菌活性(Turner et al, 1998)。

目前 cathelicidins 家族抗菌肽药物研究热点主要集中在消炎、抗感染和抗真菌等方面，应用方式可以是局部的，也可以是系统的，剂型可以是口服，也可以外用，如膏剂、喷雾剂、漱剂或洗液等。尤其由于阳离子抗菌肽的表达与皮炎、侵入性烧伤脓血症、肿瘤病毒引起的肉赘等之间的病理联系，使得 cathelicidins 家族抗菌肽在这些疾病的局部治疗方面有较好的开发前景。例如中科院昆明动物所优选出蛇 cathelicidin 抗菌肽对 500 多株临床耐药菌株显示了较强的抗菌活性，同时具有极低的哺乳动物细胞毒性以及溶血活性，优于美国正进行 III 期临床的同类候选药物 pexiganan；猪 cathelicidin 家族抗菌肽—— protegrins 治疗由放、化疗引起的口腔黏膜炎，已进入临床 III 期试验；LL-37 作为治疗囊肿

性纤维化支气管炎的局部杀菌剂及人抗菌肽CAP-18 及其衍生物用于治疗上呼吸道感染、呼吸道感染、鼻窦炎、中耳炎等疾病的药物均已经成为生物制药领域内的研究热点。不仅限于医药领域,在农业、畜牧业和日化用品领域, cathelicidins 也存在巨大的应用潜能。

然而, cathelicidins 家族抗菌肽要开发为药物,还面临几个亟待解决的问题: (1) cathelicidins 家族抗菌肽生产上的限制, 由于其相对分子质量小, 易被宿主细胞分解, 且对宿主细胞有一定毒性, 氨基酸组成不均衡, 表达效率较低, 常以融合蛋白的形式表达, 因此, 需要构建基因工程菌提高其表达量,进一步改进分离和纯化技术; (2)安全性, 大多数 cathelicidins 家族抗菌肽仍然具有一定的溶血活性和细胞毒性, 而且目前的资料不足以证明 cathelicidins 家族抗菌肽长期使用后病原菌不会产生耐药性; (3)稳定性, cathelicidins 家族抗菌肽由于含有较多的碱性氨基酸残基, 因此, 易于被人体内的蛋白酶降解, 需要对其进行分子改造, 在不影响其抗菌活性的基础上, 提高其稳定性。

目前, cathelicidins 家族抗菌肽的结构性质、生物学活性与功能、作用机制及构效关系等的研究已取得了显著的进展。相信 cathelicidins 家族抗菌肽及其相关衍生物在药理学、毒理学、药代动力学、临床疗效等方面的研究会有更快的发展, 以解决越来越严重的微生物耐药问题, 更好地造福于人类。

参考文献:

Agerberth B, Gunne H, Odeberg J, Kogner P, Boman HG, Gudmundsson GH. 1995. FALL-39, a putative human peptide antibiotic, is cysteine-free and expressed in bone marrow and testis [J]. *Proc Natl Acad Sci USA,* **92**(1): 195-199.

Boman H, Marsh J, Goode JA. 1994. Antimicrobial Peptides [M]. London: John Wiley & Son Ltd.

Dombrowski Y, Peric M, Koglin S, Kammerbauer C, Göss C, Anz D, Simanski M, Gläser R, Harder J, Hornung V, Gallo RL, Ruzicka T, Besch R, Schauber J. 2011. Cytosolic DNA triggers inflammasome activation in keratinocytes in psoriatic lesions [J]. *Sci Transl Med,* **3**(82): 82ra38.

Feng FF, Chen C, Zhu WJ, He WY, Guang HJ, Li Z, Wang D, Liu JZ, Chen M, Wang YP, Yu HN. 2011. Gene cloning, expression and characterization of avian cathelicidin orthologs, Cc‑CATHs, from *Coturnix coturnix* [J]. *FEBS J,* **278**(9): 1573-1584.

Gennaro R, Skerlavaj B, Romeo D. 1989. Purification, composition, and activity of two bactenecins, antibacterial peptides of bovine neutrophils [J]. *Infect Immun,* **57**(10): 3142-3146.

Hancock REW, Sahl HG. 2006. Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies [J]. *Nat Biotechnol,* **24**(12): 1551-1557.

Kokryakov VN, Harwig SSL, Panyutich EA, Shevchenko AA, Aleshina GM, Shamova OV, Korneva HA, Lehrer RI. 1993. Protegrins: leukocyte antimicrobial peptides that combine features of corticostatic defensins and tachyplesins [J]. *FEBS Lett,* **327**(2): 231-236.

Lehrer RI, Ganz T. 1996. Endogenous vertebrate antibiotics [J]. *Ann NY Acad Sci,* **797**(1): 228-239.

Mangoni ME, Aumelas A, Charnet P, Roumestand C, Chiche L, Despaux E, Grassy G, Calas B, Chavanieu A. 1996. Change in membrane permeability induced by protegrin 1: implication of disulphide bridges for pore formation [J]. *FEBS Lett,* 383(1/2): 93-98.

Pungerčar J, Štrukelj B, Kopitar G, Renko M, Lenarčič B, Gubenšek F, Turk V. 1993. Molecular cloning of a putative homolog of proline/arginine-rich antibacterial peptides from porcine bone marrow [J]. *FEBS Lett,* **336**(2): 284-288.

Qu XD, Harwig SS, Oren AM, Shafer WM, Lehrer RI. 1996. Susceptibility of Neisseria gonorrhoeae to protegrins [J]. *Infect Immun,* **64**(4): 1240-1245.

Romeo D, Skerlavaj B, Bolognesi M, Gennaro R. 1988. Structure and bactericidal activity of an antibiotic dodecapeptide purified from bovine neutrophils [J]. *J Biol Chem,* **263**(20): 9573-9575.

Sanchez JF, Wojcik F, Yang YS, Strub MP, Strub JM, Van Dorsselaer A, Martin M, Lehrer R, Ganz T, Chavanieu A, Galas B, Aumelas A. 2002. Overexpression and structural study of the cathelicidin motif of the protegrin-3 precursor [J]. *Biochemistry,* **41**(1): 21-30.

Sang YM, Ortega MT, Rune K, Xiau W, Zhang GL, Soulages JL, Lushington GH, Fang JW, Williams TD, Blecha F, Melgarejo T. 2007. Canine cathelicidin (K9CATH): gene cloning, expression, and biochemical activity of a novel pro-myeloid antimicrobial peptide [J]. *Dev Comp Immunol,* **31**(12): 1278-1296.

Scocchi M, Romeo D, Cinco M. 1993. Antimicrobial activity of two bactenecins against spirochetes [J]. *Infect Immun,* **61**(7): 3081-3083.

Scocchi M, Wang SL, Gennaro R, Zanetti M. 1998. Cloning and analysis of a transcript derived from two contiguous genes of the cathelicidin family [J]. *Biochim Biophys Acta,* **1398**(3): 393-396.

Shi J, Ross CR, Leto TL, Blecha F. 1996. PR-39, a proline-rich antibacterial peptide that inhibits phagocyte NADPH oxidase activity by binding to Src homology 3 domains of p47 phox [J]. *Proc Natl Acad Sci USA,* **93**(12): 6014-6018.

Tack BF, Sawai MV, Kearney WR, Robertson AD, Sherman MA, Wang W, Hong T, Boo LM, Wu HY, Waring AJ, Lehrer RI. 2002. SMAP‑29 has two LPS‑binding sites and a central hinge [J]. *Eur J Biochem,* **269**(4): 1181-1189.

Tamamura H, Murakami T, Horiuchi S, Sugihara K, Otaka A, Takada W, Ibuka T, Waki M, Yamamoto N, Fujii N. 1995. Synthesis of protegrin-related peptides and their antibacterial and anti-human immunodeficiency virus activity [J]. *Chem Pharm Bull,* **43**(5): 853-858.

Turner J, Cho Y, Dinh NN, Waring AJ, Lehrer RI. 1998. Activities of LL-37, a cathelin-associated antimicrobial peptide of human neutrophils [J]. *Antimicrob Agents Chemother,* **42**(9): 2206-2214.

Vandermeer T J, Menconi M J, Zhuang J, Wang HL, Murtaugh R, Bouza C, Stevens P, Fink M P. 1995. Protective effects of a novel 32-amino acid C-terminal fragment of CAP18 in endotoxemic pigs [J]. *Surgery,* **117**(6): 656-662.

Wang YP, Hong J, Liu XH, Yang HL, Liu R, Wu J, Wang AL, Lin DH, Lai R. 2008. Snake cathelicidin from Bungarus fasciatus is a potent peptide antibiotics [J]. *PloS One,* **3**(9): e3217.

Wang YP, Lu ZK, Feng Ff, Zhu W, Guang HJ, Liu JZ, He WY, Chi LL, Li Z, Yu HN. 2011. Molecular cloning and characterization of novel cathelicidin-derived myeloid antimicrobial peptide from *Phasianus colchicus* [J]. *Dev Comp Immunol,* **35**(3): 314-322.

Wuerth K, Hancock REW. 2011. New insights into cathelicidin modulation of adaptive immunity [J]. *Eur J Immunol,* **41**(10): 2817-2819.

Yasin B, Harwig S, Lehrer RI, Wagar EA. 1996. Susceptibility of Chlamydia trachomatis to protegrins and defensins [J]. *Infect Immun,* **64**(3): 709-713.

动 物 学 研 究 2012，Oct. 33(5): 527−536 CN 53-1040/Q ISSN 0254-5853
Zoological Research DOI：10.3724/SP.J.1141.2012.05527

大脑皮层内活动依赖的神经环路结构可塑性研究进展

饶小平[1,3], 许智祥[1,3], 徐富强[1,2,*]

(1. 中国科学院武汉物理与数学研究所 波谱与原子分子物理国家重点实验室，武汉 430071;
2. 武汉光电国家实验室，武汉 430074; 3. 中国科学院大学, 北京 100049)

摘要：哺乳动物大脑皮层内的神经环路在神经发育、学习记忆、神经和精神疾病过程中表现出令人惊异的结构和功能可塑性。随着新的成像技术及分子生物学方法的应用, 在细胞和突触水平上观察活体皮层内神经环路的动态结构变化成为可能, 因此近十年来有关活动依赖的神经环路结构可塑性方面的研究进展迅速。该文综述了该方面的部分实验结果, 重点阐述个体生长发育、丰富环境、感觉剥夺、病理状态以及学习和记忆等过程和条件下树突的结构可塑性特点, 尤其是树突棘的形态和数量变化特征; 并简单介绍轴突的结构可塑性, 以及结构可塑性相关的分子和细胞机制, 最后提出未来该领域内亟待解决的问题。

关键词：神经环路; 可塑性; 成像技术; 生长发育; 丰富环境; 感觉剥夺; 病理状态; 学习和记忆; 树突的结构可塑性; 树突棘; 轴突的结构可塑性; 分子和细胞机制
中图分类号：Q4, Q189;　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：0254-5853-(2012)05-0527-10

Progress in activity-dependent structural plasticity of neural circuits in cortex

RAO Xiao-Ping[1,3], XU Zhi-Xiang[1,3], XU Fu-Qiang[1,2,*]

(1. *State Key Laboratory of Magnetic Resonance and Atomic and Molecular Physics*, *Wuhan Institute of Physics and Mathematics*, *the Chinese Academy of Sciences*, *Wuhan* 430071, *China*; 2. *Wuhan National Laboratory for Optoelectronics*, *Wuhan* 430074, *China*; 3. *University of the Chinese Academy of Sciences*, *Beijing* 100049, *China*)

Abstract: Neural circuits of mammalian cerebral cortex have exhibited amazing abilities of structural and functional plasticity in development, learning and memory, neurological and psychiatric diseases. With the new imaging techniques and the application of molecular biology methods, observation neural circuits' structural dynamics within the cortex *in vivo* at the cellular and synaptic level was possible, so there were many great progresses in the field of the activity-dependent structural plasticity over the past decade. This paper reviewed some of the aspects of the experimental results, focused on the characteristics of dendritic structural plasticity in individual growth and development, rich environment, sensory deprivation, and pathological conditions, as well as learning and memory, especially the dynamics of dendritic spines on morphology and quantity; after that, we introduced axonal structural plasticity, the molecular and cellular mechanisms of structural plasticity, and proposed some future problems to be solved at last.

Key words: Neural circuits; Plasticity; Imaging techniques; Growth and development; Rich environment; Sensory deprivation; Pathological conditions; Learning and memory; Dendritic structural plasticity; Dendritic spine; Axonal structural plasticity; Molecular and cellular mechanism

神经环路由神经元的轴突、树突以及连接两者的突触构成。轴突将神经元信息输出到不同的区域, 有的甚至可以跨越几乎整个大脑; 树突将来自于可达几百微米的不同来源的输入信息进行整合; 突触则是神经环路中进行信息传递、交换以及计算的位置(Holtmaat & Svoboda, 2009)。神经环路可塑性涉及突触可塑性、树突可塑性、轴突可塑性以及神经细胞自身可塑性等(Mozzachiodi & Byrne, 2010), 其

收稿日期：2012-07-04；接受日期：2012-08-30
基金项目：国家自然科学基金杰出青年基金(08Q1011001); 中国科学院百人计划(08B1021001); 武汉光电国家实验室创新基金(Z08004); 中国科学院武汉物理与数学研究所重点资助项目(08K1011001)
*通信作者(Corresponding author)，Tel: 027-87197091, E-mail: fuqiang.xu@wipm.ac.cn

中突触的可塑性是整个神经环路可塑性的核心。典型的突触是由带有突触囊泡的突触前活性区(presynaptic active zone)、突触间隙(cleft)以及突触后致密区(postsynaptic density, PSD)构成(Holtmaat & Svoboda, 2009)。突触的可塑性包括突触的功能可塑性(即已经存在的突触连接强度的增加或减弱)以及突触的结构可塑性(即突触的形成或消亡)(Holtmaat & Svoboda, 2009)。突触的重要性使其在过去的几十年中一直备受关注, 目前我们对突触的功能可塑性相关现象及其分子机制已经有较深的理解(Ho et al, 2011)。而突触结构可塑性在最近十年内, 由于活体双光子显微延时成像(two-photon microscopy and time-lapse imaging)、双光子荧光寿命显微成像(two-photo fluorescence lifetime imaging microscopy, 2pFLIM)、荧光共振能量转移(fluorescence resonance energy transfer, FRET)成像以及三维重建连续切片透射式电子显微镜图像(serial section transmission electron microscopy)技术的运用, 结合大脑神经元中稀疏携带 GFP 或 YFP 等荧光蛋白的转基因动物的应用, 开启了揭示活体内神经环路结构可塑性与功能可塑性之间联系以及结构可塑性的细胞和分子机制的研究(Lendvai et al, 2000; Patterson & Yasuda, 2011)。本文仅综述该方面的最新进展。

1 树突的可塑性

神经元的树突是接受从其它神经元传入信息的入口。树突的轴干上分布着许多微小的突起, 这些突起在形态、大小、密度以及动态特征方面各不相同, 在不同的发育阶段以及不同的神经类型中也存在着差异; 虽然对树突突起的分类还存在争议, 但是一般突起可分为树突棘(spine)和丝状伪足(filopodia): 前者指较短的突起, 具有球状头部, 虽然大小不一(包括细的棘、短而粗的棘和蘑菇状的棘; 如图 1)(Amaral & Pozzo-Miller, 2009), 但基本上都能形成具有功能的突触结构; 后者指树突上细长的突起, 无球状头部, 一般不形成功能性的突触, 但有些可以转变为棘(Fu & Zuo, 2011; Holtmaat & Svoboda, 2009)。由于在成年动物大脑中, 树突分枝保持的比较稳定, 丝状伪足总数<总的突起的 10%, 且其形成或消亡的时间尺度以分钟或小时计, 因此树突的结构可塑性主要是指树突棘的可塑性(Zuo et al, 2005a)。树突棘的可塑性一般包括形态和数量的改变。形态改变指树突棘头部几何形态的变大或变小; 数量改变则指树突棘的形成或消亡, 表现为棘的更新与密度的变化。

树突棘形态或尺寸的变化以及数量的改变具有怎样的生理意义? 在正常情况下, 成熟大脑中 10%的棘具有不成熟的形态: 短而粗、多突触、具丝状伪足或分叉; 突触活动的增加或减少可以引起细的棘发生改变, 因此被认为是"学习棘"; 而蘑菇状的棘具有稳定性, 因此被称为"记忆棘"; 突触活动增强能导致细的棘转变成蘑菇状的棘(Bourne & Harris, 2007)。树突棘的体积与功能紧密相关: 蘑菇状的棘拥有较宽的 PSD, 含有较多功能性 AMPA 型谷氨酸受体以及可以产生较强的兴奋性突触后电位等(Kasai et al, 2010)。长时程增强(LTP)与长时程抑制(LTD)分别与树突棘的长期增长和萎缩相关(Park et al, 2006; Zhou et al, 2004)。因此棘的尺寸与突触强度相关, 棘的形态变化反应突触强度的变化(Matsuzaki et al, 2004)。树突棘数量的增加或减少伴随着突触的更新, 表明神经环路的连接发生了变化(Trachtenberg et al, 2002); 相对突触连接强度的变化, 新突触的形成可能更大程度地增加了大脑的记忆储存能力(Chklovskii et al, 2004); 此外, 除了对原有树突棘的修饰作用, 新的树突棘形成也与某些形式的 LTP 有关(Engert & Bonhoeffer, 1999; Toni et al, 1999)。因此, 树突棘形态的变化与突触强度的改变相关, 而树突棘数量的变化则反应了神经连接的改变(Yuste & Bonhoeffer, 2004)。

1.1 个体成长发育过程中的树突可塑性

Cajal 以及后来一系列脑组织固定观察实验发现, 哺乳动物, 包括人, 出生后早期大脑皮层均有突触的快速形成, 紧接着出现大量的树突棘/突触丢失(~50%), 直至青春期结束, 而成年期树突棘保持相对稳定, 但也存在着与年龄相关的突触丢失(Bhatt et al, 2009)。双光子活体延时成像发现, 年轻小鼠(一月龄)的视皮层、体感皮层、初级运动皮层和前额叶皮层在间隔 2 周的时间内有 13%~20%的棘消失以及 5%~8%的棘形成, 表明动物在发育期存在着广泛的树突棘丢失(Trachtenberg et al, 2002; Zuo et al, 2005a)。也有发现表明树突棘的净丢失在 2 周龄时即已开始(Holtmaat et al, 2005)。随着动物逐渐发育成熟(四月龄以前), 由于消失速度远高于形成速度, 所以, 棘的数量净损失~25%(Zuo et al, 2005a)。在成年阶段(四月龄以后), 小鼠视皮层 V

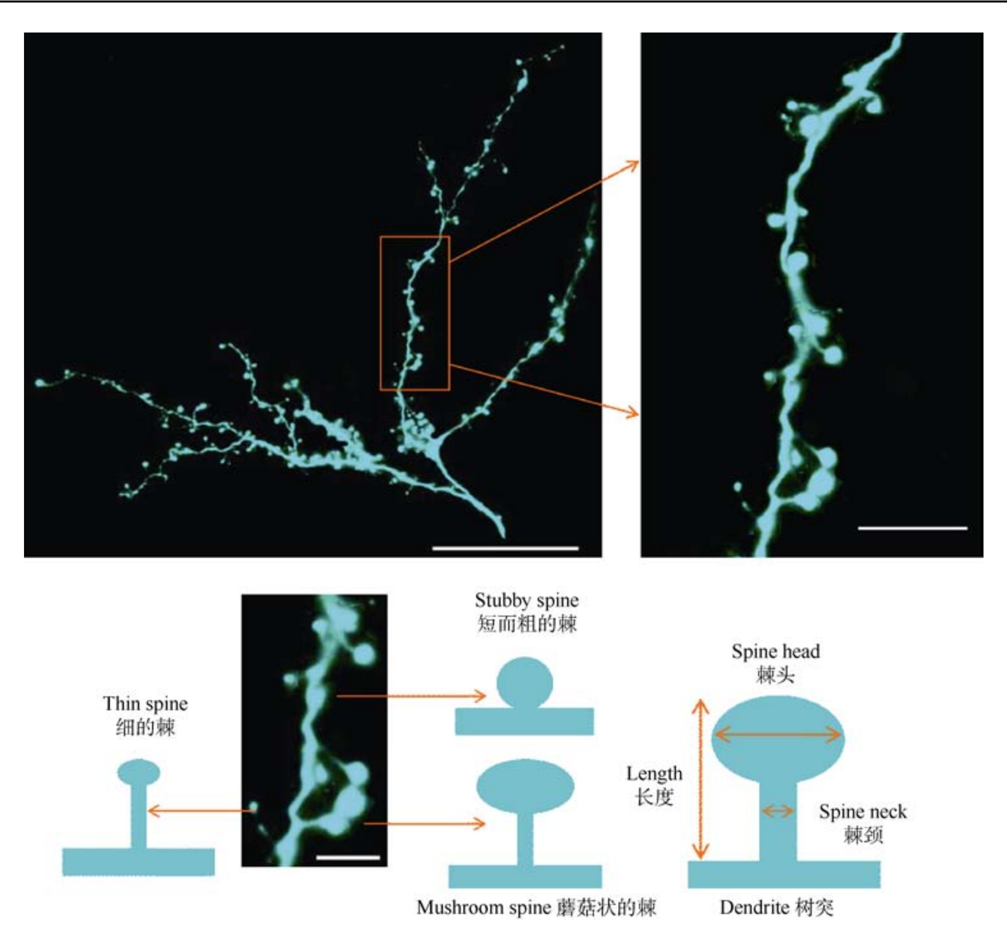


图 1　小鼠嗅球中颗粒细胞上不同类型的树突棘[修改自 Amaral & Pozzo-Miller（2009)]

Fig. 1　Different types of dendritic spines of granule cells in the olfactory bulb of mice [Modified from Amaral & Pozzo-Miller（2009)]

上图）C57 小鼠嗅球内颗粒细胞顶树突在不同放大倍数下的显微图像，可见树突分支的复杂性以及在第二级和第三级分支上存在着大量的树突棘。下图左侧）图片叠加后可以发现树突轴干上分布着最常见的三种形态的树突棘：细的棘、短而粗的棘和蘑菇状的棘；下图右侧）树突棘的分类标准常用头部直径、颈部直径以及整体长度等几何尺寸指标来定性和定量描述。上图左侧、右侧以及下图左侧的标尺分别为：50 μm、10 μm 和 5 μm。

Top panels: the apical dendrites of granule cell in the olfactory bulb of C57 mice are shown at different magnifications to illustrate the complexity of their dendritic arbors, as well as the abundance of dendritic spines on the secondary and tertiary branches. Bottom left panel: after image stack, we can find that dentritic segment was studded with the most common spine morphologies, such as thin, stubby and mushroom; Bottom right panel: the classification criteria of dendritic spine are commonly used in head diameter, neck diameter, overall length and other geometric dimensions to describe them qualitatively and quantitatively. Top left panel: Scale bar = 50 μm, Top right panel: Scale bar = 10 μm, Bottom left panel: Scale bar = 5 μm.

层锥体神经元的顶树突棘相当稳定，在 1 个月内有~4%的更新(Grutzendler et al, 2002)；而在小鼠体感皮层、初级运动皮层和前额叶皮层中有 3%~5%的棘形成或消失，70%的树突棘能够稳定存在 18 个月，且棘形成和消亡的速度相似(Zuo et al, 2005a)。但也有发现表明成年阶段的体感皮层树突棘在 8 天时间内更新~40%(Trachtenberg et al, 2002)。这可能是由于所使用动物的年龄、品系以及是否进行开颅手术等不同所造成(Bhatt et al, 2009)。丝状伪足占树突轴上突起的比例随年龄逐渐下降：在小鼠柱状皮层中，其比例从二周龄的>50%下降到一月龄的<10%；到成年阶段，其比例进一步下降至2%～3% (Zuo et al, 2005a)。

出生后的发育过程中，柱状皮层内树突棘的消亡速度下降，形成速度保持不变，因而树突棘的总量开始减少，之后保持稳定，并与年龄表现出一种单指数方程的函数关系($70.0\%+30.0\%\times0.5^{t/15.63\ d}$, $\chi^2=8.4$)：一至二月龄的动物中，32%的树突棘消亡，其平均半衰期为 11.3 天，而剩余 68%的树突棘可以保持稳定不变；相反，如果所有树突棘消亡的速度一致，成年(四月龄)动物树突棘的平均半衰期则为 13.2 个月(Grutzendler et al, 2002)。树突棘从短半衰期到长半衰期的转变，可能与关键期的结束有关；树突棘的稳定性可能经历着从关键期内较强的可

塑性转变为成年阶段较弱的可塑性的过程(Grutzendler et al, 2002)。

受双光子穿透深度所限，活体观察得到的数据有限。不同物种不同脑区不同层以及不同细胞类型的树突棘/突触数量变化都可能不同。如成年小鼠的嗅球和海马锥体神经元的树突分支或树突棘均可保持相对稳定(Mizrahi et al, 2004; Mizrahi & Katz, 2003)。总而言之，在动物出生后的早期发育过程中，大脑皮层的突触密度迅速增加，随后大量丢失，直至青春期结束；而在成年阶段，突触数量则保持相对稳定直至生命终止。因此，不论任何发育阶段，都有小部分树突棘长期维持稳定，这可能是哺乳动物皮层发育的普遍规律；因而也为基本皮层功能和终生记忆储存提供了结构基础(Yang et al, 2009)。虽然绝大部分树突棘在成年阶段能够长期存在，但树突棘的长度与头部直径等形态特征在发育阶段和成年阶段均存在着可塑性变化(Grutzendler et al, 2002; Holtmaat et al, 2005; Zuo et al, 2005a)，由于棘的尺寸与突触强度相关，棘的形态变化反应突触强度的变化，所以这种形态变化可能为短时间的信息储存提供了结构基础，也可能参与了快速可塑性，如伤害和经验引起的皮层神经环路的改变(Matsuzaki et al, 2004)。这种突触效能的改变可能会最终调控树突棘在较长时间内的形成和消亡，以及神经环路的长期改变(Grutzendler et al, 2002)。

1.2 丰富环境下的树突可塑性

丰富环境是研究感觉经验对神经可塑性作用的一个定性非常清楚的模型。丰富环境的研究一般有两种动物饲养方式：(1)空间限制、环境单调、笼子小以及无社会性交往等；(2)大笼子，有玩具、巢穴、障碍物、群养以及给予充分的解决问题的机会和复杂的社交环境等(Alvarez & Sabatini, 2007)。因此，丰富环境涵盖感觉刺激，学习，运动，社交等多种成分。

丰富环境可以提高认知表现和学习，提高海马的 LTP，影响基因表达、细胞增殖和存活率，以及突触形成和神经元形态(Alvarez & Sabatini, 2007)。在神经元形态方面，丰富环境能增加皮层和海马某些区域的锥体神经元树突的分叉、树突棘的密度以及突触的数量，PSD 的数量和平均长度，以及位于树突棘头部的多聚核糖体的数量。丰富环境对活动依赖可塑性的影响在所有年龄阶段均有表现，甚至出生前的丰富环境也能提升大鼠的某些特异性行为(Alvarez & Sabatini, 2007)。

在小鼠的柱状皮层中，丰富环境可以让先前存在的树突棘变得不稳定：据估计，丰富环境下有~73%先前存在的树突棘能从一月龄维持到二月龄，低于标准环境 5%；四月龄成年小鼠在丰富环境中有~83%的旧棘能存在 5 个月，低于标准环境 3%；丰富环境下~90%旧棘的平均寿命为 71 个月，低于标准环境~19 个月；丰富环境下~37%在一月龄时存在的棘能持续到动物生命的终点，低于标准环境 11%(Yang et al, 2009)。另外，丰富环境可以引起新的树突棘形成，<0.8%的新树突棘在丰富环境中可以存在 80 个月，而在标准的饲养环境中可以存在 73 个月，即丰富环境可以使新形成的树突棘更为稳定(Yang et al, 2009)。丰富环境对树突棘可塑性的影响与学习训练的效果相同(Yang et al, 2009)。

1.3 感觉剥夺后的树突可塑性

活动经验对神经连接模式以及行为的影响将贯穿动物一生是神经系统的一个基本特征，经验/神经活动对突触形成，尤其是神经环路的构建具有关键作用(Bhatt et al, 2009)。在青春期(一月龄)，剪掉一侧的全部胡须(感觉剥夺)能降低柱状皮层内顶树突棘的消亡速度，而对树突棘的形成没有影响，从而可以阻止树突棘的净丢失，表现为树突棘数量或密度的增加；而恢复动物的胡须感觉后树突棘加速消亡；且在丝状伪足中未发现类似现象(Zuo et al, 2005b)。以上结果说明经验/神经活动依赖的神经连接的修饰过程对哺乳动物神经系统的发育成熟极其重要(Bhatt et al, 2009)，且该效应随动物的成熟而减弱。例如，在树突棘逐渐趋于稳定的成年期(四月龄以上)，2 周时间的感觉剥夺对柱状皮层内棘的形成或丢失无显著影响，但是长期感觉剥夺(2 个月)则会引起树突棘消失速度的轻微下降(~3%)(Zuo et al, 2005b)。而采用剃掉单个胡须保持周边完整的棋盘剥夺方式，有的结果相同(Zuo et al, 2005b)，有的结果却表明感觉剥夺无论是在青春期还是成年期都只影响棘的动态性而不影响棘密度；剃掉胡须能增加新形成的树突棘的稳定性，而降低长期存在的树突棘的稳定性。因此，感觉剥夺使旧的树突棘失去稳定而使新的树突棘变得稳定，总的效果为增加树突棘的动态性，导致突触连接变化更快(Holtmaat et al, 2006; Trachtenberg et al, 2002)。

黑暗饲养、单眼剥夺(MD)和双眼剥夺(BD)为研究视觉皮层可塑性普遍采用的三种模型。黑暗饲养

会引起动物树突棘密度的下降；关键期内 4 天的 MD 可以引起小鼠视皮层第 Ⅲ 层顶部和底部树突棘的快速消失(Mataga et al, 2004)。虽然棘的形态变化和更新随着年龄的增长而下降，但是感觉剥夺在发育过程中对棘的动态性的影响在不同的皮层内可能有所差别。在体感皮层的快速突触形成时期(P11-P13)，剃须会导致 II/III 层神经元树突棘的形态变化程度下降(Lendvai et al, 2000)，BD 却能在视皮层关键期的顶峰时期(P28)提高 V 层树突棘的形态变化程度(Majewska & Sur, 2003)，而且不同深度皮层的树突棘形态具有不同的变化特点(Oray et al, 2004)，树突棘这种层次特异性的变化特征可能是由处于不同位置的特异性分子构成所决定(Mataga et al, 2004; Oray et al, 2004)。因此，对于中枢的某个神经元，感觉刺激只能不同程度地影响特定区域范围内相关的神经连接(Fox & Wong, 2005)。

总之，感觉经验/神经活动对树突棘/突触净丢失的作用几乎贯穿动物一生，尤其是青少年时期(Zuo et al, 2005b)；成年期感觉剥夺引起的可塑性与关键期的可塑性在某些方面具有相似性，虽然前者需要更长的剥夺时间，说明关键期在某些方面并非骤然结束，而是以渐进的形式趋向关闭状态(Alvarez & Sabatini, 2007)。

1.4　病理条件下的树突可塑性

树突棘的形态和数量与神经功能联系紧密，改变树突棘的形态结构以及干扰树突棘的形成或消亡等都可能对神经环路产生影响，甚至导致一系列认知功能障碍(Bhatt et al, 2009)。许多神经和精神疾病都与树突棘形态或密度的大量改变有关。例如，脆性 X 综合症(FXS)，是一种最普遍的遗传性智障，虽然具有较高的树突棘浓度，但多数为不成熟的、又长又细的棘，不能发育为蘑菇状的棘，且更新速度较快，状态不稳定，不受感觉经验的操控(Pan et al, 2010)，同时表现出由代谢型谷氨酸受体调控的 LTD 的增强(Bear et al, 2004)；而三染色体 21(*trisomy 21*)，也叫蒙古症(Mongolism)或唐氏症(Down syndrome)，是一种染色体异常的病变，通常会造成心智障碍，大脑新皮层和海马区的树突棘密度一般比较低(Kaufmann & Moser, 2000)。此外，树突棘形态和数量的异常也常常出现在其它的大脑神经紊乱或疾病中，如成瘾、恐惧、抑郁、朊病毒病或蛋白粒子病、癫痫、缺血症和中风等(Bhatt et al, 2009)。

树突棘的结构变化也可能是许多与年龄有关的神经退行性疾病的发病机理，如阿尔兹海默症(Alzheimer's disease, AD)。通过活体观察 AD 小鼠和 YFP 小鼠的杂交后代发现，淀粉样蛋白沉积能诱发附近神经元结构的持续改变，不论是穿越还是靠近淀粉样蛋白沉积斑块的神经元均表现某种程度上的树突棘丢失和树突轴直径下降(Tsai et al, 2004)。针对年龄增长引起的认知功能下降的治疗方案可以引起细的树突棘数量特异性增加(Hao et al, 2006)，表明在衰老的大脑中需要细的树突棘以重建或恢复突触可塑性与学习潜力(Bourne & Harris, 2007)。各种大脑神经疾病伴随着树突棘形态或密度的巨大变化，充分说明了树突棘的动态变化在正常环境中是保持动态平衡的，但是这种状态很容易受到不同病理条件下的多种因素影响而失衡(Bhatt et al, 2009)。

1.5　学习和记忆过程中的树突可塑性

通过双光子延时成像活体观察运动技能学习小鼠运动皮层的锥体神经元顶树突的结构变化发现，无论是在青春期还是成年期，学习均可引起新树突棘的快速形成，同时也导致先前存在的旧树突棘变得不稳定并快速消亡(如图 2b)；虽然棘的形成速度高于消亡，但是持续时间较短，因而树突棘总量保持不变(如图 2c)(Xu et al, 2009; Yang et al, 2009; Ziv & Ahissar, 2009)。新棘形成快，消亡也快，但是重复训练可以使新形成的树突棘变得更加稳定，训练结束后也能持续较长时间(Xu et al, 2009)。小鼠进行运动技能训练后三个月，即使 30%~40%新形成的棘发生消亡(或突触丢失)，依然能维持先前学习的运动技能；新形成的棘存在的越多，记得越牢，行为表现越好；同时，行为表现也与旧棘的消亡相关，消亡越多，行为表现也越好(Yang et al, 2009)；说明大多数稳定的神经环路依然能保留先前学习的技巧(Yang et al, 2009)；训练后的复习阶段虽然没有新棘的形成，但是学习新技能时仍然能引起新棘的大量形成(如图 2d)(Xu et al, 2009; Yang et al, 2009; Ziv & Ahissar, 2009)，说明不同的运动技能引起不同的棘形成和消亡，即不同的记忆编码在不同的突触群中(Xu et al, 2009; Ziv & Ahissar, 2009)；此外，长时间重复训练可以引起~1/3 新形成的棘成簇状或相邻分布，相对分散分布的新形成的棘，簇状分布的新棘具有较高的稳定性，倾向于出现在与旧棘相邻近的空白位置上，而分散分布的新棘在树突

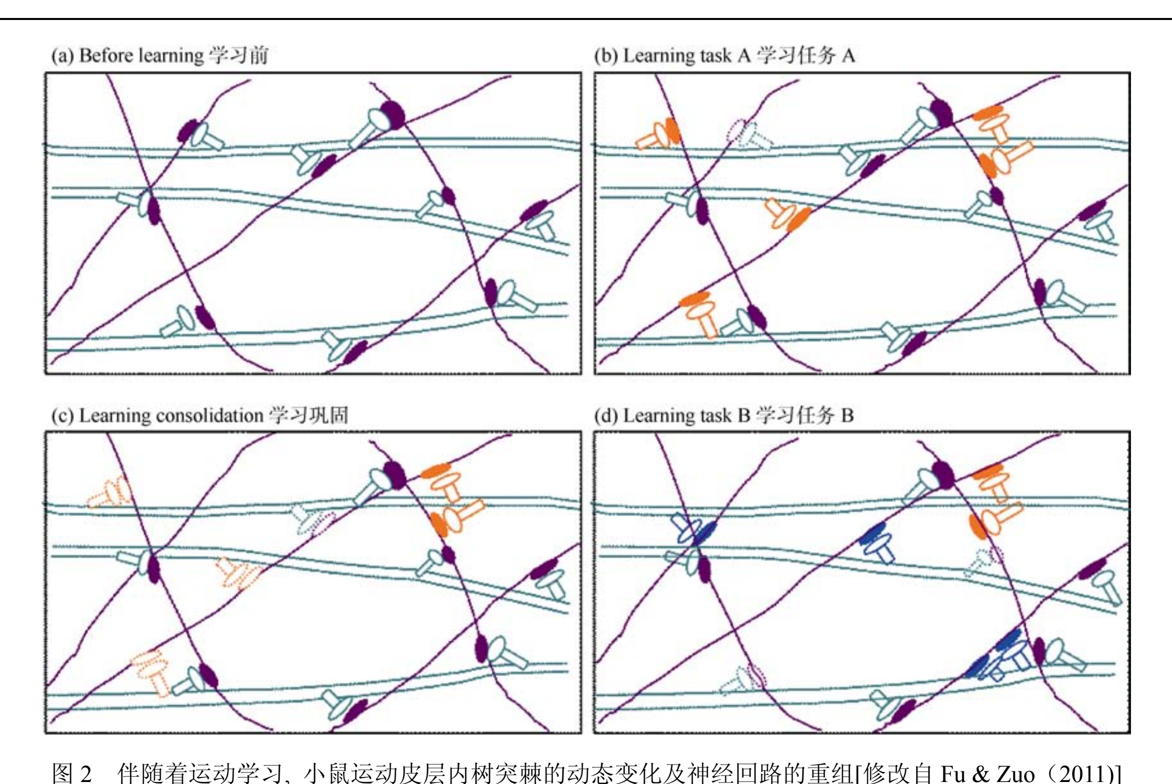


图 2 伴随着运动学习，小鼠运动皮层内树突棘的动态变化及神经回路的重组[修改自 Fu & Zuo（2011)]

Fig. 2 The dynamics of dendritic spines and circuits remodelling associated with motor task learning in motor cortex of mice [Modified from Fu & Zuo（2011)]

a) 轴突中途结(紫色)与树突的突起(树突棘, 绿色实线)形成突触; b)学习一个运动技能(任务 A)伴随着新的树突棘的形成(桔红色实线)以及旧的树突棘的消失(绿色虚线); c)学习任务 A 后的记忆巩固过程中, 旧的以及新形成的树突棘(桔红色虚线)均有消失; d)学习新的运动技能(任务 B)能引起新的树突棘形成(蓝色实线)以及旧的树突棘消失, 而对在之前运动技能学习(任务 A)过程中新形成的树突棘没有影响。

a. Synapse consists of axonal boutton (purple) and the neighboring dentritic spine (green); b. Learning a motor skill (task A) is accompanied by the formation of new dendritic spines (orange-red, solid line) and the disappearance of the old spines (green, dotted line); c. After the learning task A, old (green, dotted line) and new spines (orange-red, dotted line) disappeared in the process of memory consolidation; d. Learning task B could induce new spines formation (blue, solid line) and old spines disappearance, but don't affect the new spines formed in motor skill learning (task A) previously.

上均匀分布, 会避免与旧棘靠近(如图 2b,c); 这说明记忆在单个神经元上的储存可能具有空间信息(Fu et al, 2012)。

基于新棘的形成速度和存活比例在动物一生中保持不变, 可以推测日常形成的新树突棘平均寿命为 1.5 天, 其中小部分的平均寿命为 1~2 月, 而<0.8%的棘在标准饲养环境中可以存在 73 个月(Yang et al, 2009)。两天训练过程中形成的并能长期稳定存在的新树突棘占总树突棘数量的比例<0.04%, 假设动物寿命为36个月, 那么学习引起并能长期存在的新棘数量为~2×10^6, 数量足够大, 对神经环路重新构建以及动物行为具有重要和终生的影响(Yang et al, 2009)。同时~78%的旧棘能从一月龄维持到二月龄, 如果动物生命周期为 36 个月, 一月龄即已存在的棘中~48%能持续到动物生命终点; 此外, 四月龄成年小鼠在标准环境中有~86%的棘能存在 5 个月(Yang et al, 2009); 因此, 出生后一个月内形成的大部分树突棘能持续存在一生, 因而也为基本皮层功能和终生记忆储存提供了结构基础(Yang et al, 2009)。虽然神经环路存在持续的可塑性变化, 但是神经环路中存在着两类稳定的树突棘：一类是由新经历引起并长久存在的新棘(<0.04%); 另一类来自于出生后早期大量形成并在发育过程中由不同经历修饰且能长久存在的棘; 由于这两类树突棘的平均寿命在 70~90 个月左右, 因而这些树突棘的 60%~70%能在动物的一生中持续存活, 并直接提供神经环路的终生记忆(Yang et al, 2009)。

在鸣禽的歌唱学习模型中, 发现敏感期或关键期内的斑胸草雀(*Zebra Finch*)负责听觉信息与控制歌唱动作的交叉脑区-前脑 HVC 神经元的树突棘, 在唱歌学习前表现较高的活性, 而歌唱学习可以引起 HVC 神经元树突棘的快速稳定, 以及数量的积累和体积的增大; 歌唱学习前树突棘的更新程度越

高，动物稍后模仿唱歌的学习能力越强；通过记录胞内电活动发现学习过程中的神经活动也显著提高，因此树突棘的快速稳定以及突触连接的增强发生在学习开始前，可能对于控制学习行为非常重要(Roberts et al, 2010)。

1.6 抑制性中间神经元的树突可塑性

占成熟大脑皮层神经元种类 20%~30%的抑制性中间神经元，一般在本区域内进行树突分叉，并在局部神经环路中起调控作用，但是大部分新皮层中的中间神经元树突轴上没有树突棘(Markram et al, 2004)。关于中间神经元结构可塑性的活体研究不多，利用活体双光子成像发现，皮层中间神经元的树突分支活动性较强(Lee et al, 2006)，嗅球颗粒细胞的树突分支表现一定的动态特征(Mizrahi, 2007)。利用 RNA 干扰 Na^{+}通道活性从而降低嗅球颗粒细胞兴奋性或通过堵鼻子等方法减少嗅觉输入，都能引起嗅球中这种抑制性新生中间神经元树突棘密度的下降(Dahlen et al, 2011; Saghatelyan et al, 2005)。单眼剥夺和双眼剥夺能引起中间神经元动态变化的树突分支的比例增加了 3 倍，与兴奋性锥体神经元类似，感觉剥夺期间每周~10%的中间神经元突触发生更新(Chen & Nedivi, 2010)。因而推测成熟大脑皮层中的兴奋性和抑制性突触可能具有相同程度的结构可塑性(Fu & Zuo, 2011)。

2 轴突可塑性

轴突是神经元信息的输出结构。轴突结(axonal boutons)是突触前结构，具有不同的形态：中途结(*en passant* boutons)是沿着轴突纤维上的小的膨起(varicosities)；终端结(*terminaux* boutons)是分布在轴突末端的膨起，类似于球状头部的树突棘(De Paola et al, 2006)。虽然在小鼠的丘脑皮层中发现轴突分枝以及形态尺寸在几个月内都能保持稳定，但是不同类型神经元轴突结的形态和活动性都呈现不同的特点(De Paola et al, 2006)。在成年猴初级视皮层中也发现绝大多数轴突分支形式不变，只有少量较短分枝上的终端结和少量的中途结每周有更新，轴突结形成和消亡的数量占总数的 7%，整体密度无变化(Stettler et al, 2006)。对于感觉损毁的反应，皮层神经元轴突也经历着快速的较大范围的改变，即使是在成年阶段。恒河猴双眼剥夺一周后，初级视皮层内朝向损毁投射脑区的轴突生长增加 2 倍; 1 个月后，由于轴突结的修饰和生长现象同时存在，其轴突浓度才开始下降，但也保持了轴突数量的净增加；同时，轴突结的更新也开始上升(Yamahachi et al, 2009)。成年小鼠胡须剪掉后体感皮层内兴奋性和抑制性神经元的轴突呈现大量和快速的变化，并伴随轴突结浓度的快速上升；兴奋性神经元呈水平投射的轴突净增加，投射范围从未剪掉胡须的桶状皮层柱延伸到剪掉胡须的桶状皮层柱；剪掉胡须的桶状皮层柱内的抑制性神经元内，只有靠近胞体附近的轴突有缩回，其它大多数轴突可以超过正常范围地远距离投射到周围没有剪掉胡须的柱状皮层中，并保持稳定；这也说明兴奋性和抑制性的平衡是感觉剥夺后拓扑重构的基础(Marik et al, 2010)。从上述实验中可见成年动物大脑中轴突分枝非常稳定，同时，轴突也保留着一定程度的结构可塑性。但是总体而言，轴突结的活动性程度低于树突棘(De Paola et al, 2006)，这也解释了有些新的树突棘不能形成突触，而有些新的树突棘与已存在的轴突结形成突触(Fu & Zuo, 2011)。

3 结构可塑性的细胞和分子机制

突触强度和数量的变化是紧密关联、互相依赖的，在活动调控突触形成和丢失的过程中，突触增强先于突触数量的增加，突触减弱先于突触数量的减少(Leslie & Nedivi, 2011)。因此，结构可塑性与功能可塑性可能具有部分重叠的细胞和分子机制。

据现有的体内和体外实验发现，LTP 过程中，单个树突棘内发生着肌动蛋白聚合或解聚、细胞膜重新分布、局部蛋白合成以及谷氨酸受体的胞吞和胞吐等细胞过程(Kennedy & Ehlers, 2006)，最终效应即为在突触后膜中插入 AMPA 型谷氨酸受体、增强突触连接的强度、以及使被激活的树突棘体积增大或形成新的树突棘(Derkach et al, 2007)。LTP 信号起始于 Ca^{2+}通过 NMDA 型谷氨酸受体进入突触后，使树突棘内 Ca^{2+}浓度上升，从而激活了许多信号蛋白，包括蛋白激酶 C (PKC)、Ca^{2+}/钙调素-依赖的激酶 II (CaMKII)、以及小 G 蛋白(small GTPase proteins)(如 Ras 和 Rho)，而这些信号分子又引发了上述细胞活动过程，进而产生结构和功能的可塑性(Kennedy et al, 2005)。最近的体外实验证明了上述信号通路参与了谷氨酸释放诱发树突棘形成的过程(Kwon & Sabatini, 2011)。

神经活动不仅能控制神经元的结构和功能的适应性变化，同时也能改变基因的表达模式，因为

长期记忆、LTP 或 LTD 以及发育过程中神经环路的修饰都依赖于新的 RNA 和蛋白合成, 表明活动调控的基因也参与了神经可塑性的调控(Leslie & Nedivi, 2011)。神经活动触发 Ca^{2+}内流, 激活一系列信号传导通路, 并进入核内活化 cAMP 反应元素结合蛋白(CREB)、血清应答因子和肌细胞增强因子-2 等一系列转录因子, 进而启动新的基因表达(Greer & Greenberg, 2008)。据估计, 大脑中受活动调控的基因约有 500~1 000 个, 其编码产物包括转录因子、信号转导蛋白、神经营养因子, 以及突触结构和功能蛋白等可以直接或间接控制神经元形态和功能的蛋白(Nedivi et al, 1993)。神经活动一般可以引起细胞核内前后两个阶段的转录反应, 即早基因(immediate early genes, IEGS)转录反应时期和延迟早期基因(the delayed early genes)转录反应时期, 但由于前者一般是转录因子, 促进后者的转录反应, 加之即早基因的表达不具有时间和空间特异性, 大部分基因功能研究偏重于后者。其中, 参与调节突触连接增强和减弱的有：基因信号调节蛋白 2 基因(regulator of gene signaling 2, rgs2)、活动调控的细胞骨架伴生蛋白基因(activity-regulated cytoskeleton-associated protein, arc/arg3.1)、可塑性相关基因2(candidate plasticity gene 2, cpg2)、Homer 同源物 1a 基因(Homer homolog 1a, homer1a)和血清诱导激酶基因(serum-induced kinase, snk); 调节突触数量增加和减少的基因有：可塑性相关基因 15(candidate plasticity gene 15, cpg15)、组织型纤溶酶原激活剂基因(tissue-type plasminogen activator, tPA)、活动调控的类钙黏着蛋白(activity regulated cadherin-like protein, arcadlin)、神经元 PAS 域蛋白 4 基因(neuronal PAS domain protein 4, npas4)和神经活动调节穿透素基因(neuronal activity-regulated pentraxin, narp); 也有直接调节突触形态的基因, 如脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, bdnf)等(Leslie & Nedivi, 2011)。

除特定基因的活动依赖性调控表达外, 还有活动依赖性的转录后调控, 包括：mRNA 从胞体运输到树突和轴突的调控、突触活动在树突引起局部翻译活动的调控、活动依赖型胞外蛋白分泌的调控、活动调控的 mRNA 降解等(Leslie & Nedivi, 2011)。总体而言, 神经活动激活了从突触到胞核的信号通路, 并启动一系列新的基因表达程序, 这些基因产物通过一系列细胞过程来实现神经功能和结构的改变, 包括突触增强或减弱以及突触形成或消亡, 调整原有神经环路和形成新的神经连接, 这就是活动依赖的神经可塑性发生的整个过程(Leslie & Nedivi, 2011)。

4 研究展望

虽然对神经环路的结构可塑性及其分子细胞机制的研究已经深入到突触水平, 但是很多问题仍未完全解决。哪些信号能触发树突棘的增大和萎缩, 哪些信号可以调控树突棘的更新, 并怎样相互协调？哪些因素可以使树突棘变得稳定？稳定的蘑菇状树突棘还对神经活动敏感吗？不同大脑皮层以及同一皮层不同层内树突棘稳定性的差异是来自于神经元本身的差异, 还是皮层局部活动模式的差异？树突棘形态或更新异常的机制是什么？树突棘可塑性的改变如何导致临床症状和疾病进展？结构可塑性与突触的功能变化相关性多大？突触结构的变化对神经环路的改变起多大作用？神经结构的动态变化是行为改变的原因还是结果？程序性记忆的巩固可能与树突棘的稳定相关, 那么陈述性记忆巩固的结构基础是否类似？动态变化的神经环路如何维持永久的记忆？活动依赖型相关基因与功能？关键期可塑性的作用到底是什么(Alvarez & Sabatini, 2007; Fu & Zuo, 2011; Kennedy & Ehlers, 2006)？

现有的双光子显微成像技术只能观察到树突棘的更新, 不能准确观察到树突棘形态变化的程度以及该树突棘是否具有功能等, 因此需要结合其它技术, 包括神经活动标志物(如 Ca^{2+}敏感荧光蛋白)、可以进行特异性活动调控的光遗传学标记及电镜等。此外, 树突棘和轴突结作为突触前后的相关结构, 其可塑性是否相同, 是否在相同活动中变化一致均不清楚, 因此需要同时监测两者的结构变化。

总之, 一个具有功能的成熟的神经系统是从最初的一群不精确的突触连接通过选择性地建立及消除一些突触的过程来完成的, 这些过程是基于基因与经历的共同调节(Bhatt et al, 2009)。通过研究神经环路的结构可塑性, 为我们更深入的理解神经的发育、学习和记忆以及神经和精神疾病机制提供了重要信息。

参考文献：

Alvarez VA, Sabatini BL. 2007. Anatomical and physiological plasticity of dendritic spines [J]. *Annu Rev Neurosci,* **30**: 79-97.

Amaral MD, Pozzo-Miller L. 2009. The dynamics of excitatory synapse formation on dendritic spines [J]. *Cellscience,* **5**(4): 19-25.

Bear MF, Huber KM, Warren ST. 2004. The mGluR theory of fragile X mental retardation [J]. *Trends Neurosci,* **27**(7): 370-377.

Bhatt DH, Zhang SX, Gan WB. 2009. Dendritic spine dynamics [J]. *Annu Rev Physiol,* **71**: 261-282.

Bourne J, Harris KM. 2007. Do thin spines learn to be mushroom spines that remember [J]? *Curr Opin Neurobiol,* **17**(3): 381-386.

Chen JL, Nedivi E. 2010. Neuronal structural remodeling: is it all about access [J]? *Curr Opin Neurobiol,* **20**(5): 557-562.

Chklovskii DB, Mel BW, Svoboda K. 2004. Cortical rewiring and information storage [J]. *Nature,* **431**(7010): 782-788.

Dahlen JE, Jimenez DA, Gerkin RC, Urban NN. 2011. Morphological analysis of activity-reduced adult-born neurons in the mouse olfactory bulb [J]. *Front Neurosci,* **5**: 66.

De Paola V, Holtmaat A, Knott G, Song S, Wilbrecht L, Caroni P, Svoboda K. 2006. Cell type-specific structural plasticity of axonal branches and boutons in the adult neocortex [J]. *Neuron,* **49**(6): 861-875.

Derkach VA, Oh MC, Guire ES, Soderling TR. 2007. Regulatory mechanisms of AMPA receptors in synaptic plasticity [J]. *Nat Rev Neurosci,* **8**(2): 101-113.

Engert F, Bonhoeffer T. 1999. Dendritic spine changes associated with hippocampal long-term synaptic plasticity [J]. *Nature,* **399**(6731): 66-70.

Fox K, Wong ROL. 2005. A comparison of experience-dependent plasticity in the visual and somatosensory systems [J]. *Neuron,* **48**(3): 465-477.

Fu M, Yu XZ, Lu J, Zuo Y. 2012. Repetitive motor learning induces coordinated formation of clustered dendritic spines *in vivo* [J]. *Nature,* **483**(7387): 92-95.

Fu M, Zuo Y. 2011. Experience-dependent structural plasticity in the cortex [J]. *Trends Neurosci,* **34**(4): 177-187.

Greer PL, Greenberg ME. 2008. From synapse to nucleus: calcium-dependent gene transcription in the control of synapse development and function [J]. *Neuron,* **59**(6): 846-860.

Grutzendler J, Kasthuri N, Gan WB. 2002. Long-term dendritic spine stability in the adult cortex [J]. *Nature,* **420**(6917): 812-816.

Hao JD, Rapp PR, Leffler AE, Leffler SR, Janssen WGM, Lou W, McKay H, Roberts JA, Wearne SL, Hof PR, Morrison JH. 2006. Estrogen alters spine number and morphology in prefrontal cortex of aged female rhesus monkeys [J]. *J Neurosci,* **26**(9): 2571-2578.

Ho VM, Lee JA, Martin KC. 2011. The cell biology of synaptic plasticity [J]. *Science,* **334**(6056): 623-628.

Holtmaat A, Svoboda K. 2009. Experience-dependent structural synaptic plasticity in the mammalian brain [J]. *Nat Rev Neurosci,* **10**(9): 647-658.

Holtmaat A, Wilbrecht L, Knott GW, Welker E, Svoboda K. 2006. Experience-dependent and cell-type-specific spine growth in the neocortex [J]. *Nature,* **441**(7096): 979-983.

Holtmaat AJGD, Trachtenberg JT, Wilbrecht L, Shepherd GM, Zhang XQ, Knott GW, Svoboda K. 2005. Transient and persistent dendritic spines in the neocortex in vivo [J]. *Neuron,* **45**(2): 279-291.

Kasai H, Fukuda M, Watanabe S, Hayashi-Takagi A, Noguchi J. 2010. Structural dynamics of dendritic spines in memory and cognition [J]. *Trends Neurosci,* **33**(3): 121-129.

Kaufmann WE, Moser HW. 2000. Dendritic anomalies in disorders associated with mental retardation [J]. *Cereb Cortex,* **10**(10): 981-991.

Kennedy MB, Beale HC, Carlisle HJ, Washburn LR. 2005. Integration of biochemical signalling in spines [J]. *Nat Rev Neurosci,* **6**(6): 423-434.

Kennedy MJ, Ehlers MD. 2006. Organelles and trafficking machinery for postsynaptic plasticity [J]. *Annu Rev Neurosci,* **29**: 325-362.

Kwon HB, Sabatini BL. 2011. Glutamate induces de *novo* growth of functional spines in developing cortex [J]. *Nature,* **474**(7349): 100-104.

Lee WC, Huang H, Feng GP, Sanes JR, Brown EN, So PT, Nedivi E. 2006. Dynamic remodeling of dendritic arbors in GABAergic interneurons of adult visual cortex [J]. *PLoS Biol,* **4**(2): e29.

Lendvai B, Stern EA, Chen B, Svoboda K. 2000. Experience-dependent plasticity of dendritic spines in the developing rat barrel cortex *in vivo* [J]. *Nature,* **404**(6780): 876-881.

Leslie JH, Nedivi E. 2011. Activity-regulated genes as mediators of neural circuit plasticity [J]. *Prog Neurobiol,* **94**(3): 223-237.

Majewska A, Sur M. 2003. Motility of dendritic spines in visual cortex in vivo: changes during the critical period and effects of visual deprivation [J]. *Proc Natl Acad Sci USA,* **100**(26): 16024-16029.

Marik SA, Yamahachi H, McManus JNJ, Szabo G, Gilbert CD. 2010. Axonal dynamics of excitatory and inhibitory neurons in somatosensory cortex [J]. *PLoS Biol,* **8**(6): e1000395.

Markram H, Toledo-Rodriguez M, Wang Y, Gupta A, Silberberg G, Wu CZ. 2004. Interneurons of the neocortical inhibitory system [J]. *Nat Rev Neurosci,* **5**(10): 793-807.

Mataga N, Mizuguchi Y, Hensch TK. 2004. Experience-dependent pruning of dendritic spines in visual cortex by tissue plasminogen activator [J]. *Neuron,* **44**(6): 1031-1041.

Matsuzaki M, Honkura N, Ellis-Davies GCR, Kasai H. 2004. Structural basis of long-term potentiation in single dendritic spines [J]. *Nature,* **429**(6993): 761-766.

Mizrahi A. 2007. Dendritic development and plasticity of adult-born neurons in the mouse olfactory bulb [J]. *Nat Neurosci,* **10**(4): 444-452.

Mizrahi A, Crowley JC, Shtoyerman E, Katz LC. 2004. High-resolution *in vivo* imaging of hippocampal dendrites and spines [J]. *J Neurosci,* **24**(13): 3147-3151.

Mizrahi A, Katz LC. 2003. Dendritic stability in the adult olfactory bulb [J]. *Nat Neurosci,* **6**(11): 1201-1207.

Mozzachiodi R, Byrne JH. 2010. More than synaptic plasticity: role of nonsynaptic plasticity in learning and memory [J]. *Trends Neurosci,* **33**(1): 17-26.

Nedivi E, Hevroni D, Naot D, Israeli D, Citri Y. 1993. Numerous candidate plasticity-related genes revealed by differential cDNA cloning [J]. *Nature,* **363**(6431): 718-722.

Oray S, Majewska A, Sur M. 2004. Dendritic spine dynamics are regulated by monocular deprivation and extracellular matrix degradation [J]. *Neuron,* **44**(6): 1021-1030.

Pan F, Aldridge GM, Greenough WT, Gan WB. 2010. Dendritic spine instability and insensitivity to modulation by sensory experience in a mouse model of fragile X syndrome [J]. *Proc Natl Acad Sci USA,* **107**(41): 17768-17773.

Park M, Salgado JM, Ostroff L, Helton TD, Robinson CG, Harris KM, Ehlers MD. 2006. Plasticity-induced growth of dendritic spines by exocytic trafficking from recycling endosomes [J]. *Neuron,* **52**(5): 817-830.

Patterson M, Yasuda R. 2011. Signalling pathways underlying structural plasticity of dendritic spines [J]. *Br J Pharmacol,* **163**(8): 1626-1638.

Roberts TF, Tschida KA, Klein ME, Mooney R. 2010. Rapid spine stabilization and synaptic enhancement at the onset of behavioural learning [J]. *Nature,* **463**(7283): 948-952.

Saghatelyan A, Roux P, Migliore M, Rochefort C, Desmaisons D, Charneau P, Shepherd GM, Lledo PM. 2005. Activity-dependent adjustments of the inhibitory network in the olfactory bulb following early postnatal deprivation [J]. *Neuron,* **46**(1): 103-116.

Stettler DD, Yamahachi H, Li W, Denk W, Gilbert CD. 2006. Axons and synaptic boutons are highly dynamic in adult visual cortex [J]. *Neuron,* **49**(6): 877-887.

Toni N, Buchs PA, Nikonenko I, Bron CR, Muller D. 1999. LTP promotes formation of multiple spine synapses between a single axon terminal and a dendrite [J]. *Nature,* **402**(6760): 421-425.

Trachtenberg JT, Chen BE, Knott GW, Feng GP, Sanes JR, Welker E, Svoboda K. 2002. Long-term *in vivo* imaging of experience-dependent synaptic plasticity in adult cortex [J]. *Nature,* **420**(6917): 788-794.

Tsai J, Grutzendler J, Duff K, Gan WB. 2004. Fibrillar amyloid deposition leads to local synaptic abnormalities and breakage of neuronal branches [J]. *Nat Neurosci,* **7**(11): 1181-1183.

Xu TH, Yu XZ, Perlik AJ, Tobin WF, Zweig JA, Tennant K, Jones T, Zuo Y. 2009. Rapid formation and selective stabilization of synapses for enduring motor memories [J]. *Nature,* **462**(7275): 915-919.

Yamahachi H, Marik SA, McManus JNJ, Denk W, Gilbert CD. 2009. Rapid axonal sprouting and pruning accompany functional reorganization in primary visual cortex [J]. *Neuron,* **64**(5): 719-729.

Yang G, Pan F, Gan WB. 2009. Stably maintained dendritic spines are associated with lifelong memories [J]. *Nature,* **462**(7275): 920-924.

Yuste R, Bonhoeffer T. 2004. Genesis of dendritic spines: insights from ultrastructural and imaging studies [J]. *Nat Rev Neurosci,* **5**(1): 24-34.

Zhou Q, Homma KJ, Poo MM. 2004. Shrinkage of dendritic spines associated with long-term depression of hippocampal synapses [J]. *Neuron,* **44**(5): 749-757.

Ziv NE, Ahissar E. 2009. Neuroscience: New tricks and old spines [J]. *Nature,* **462**(7275): 859-861.

Zuo Y, Lin A, Chang P, Gan WB. 2005a. Development of long-term dendritic spine stability in diverse regions of cerebral cortex [J]. *Neuron,* **46**(2): 181-189.

Zuo Y, Yang G, Kwon E, Gan WB. 2005b. Long-term sensory deprivation prevents dendritic spine loss in primary somatosensory cortex [J]. *Nature,* **436**(7048): 261-265.

中国科学院武汉物理与数学研究所神经影像实验室简介

中国科学院武汉物理与数学研究所神经影像实验室建立于 2007 年 4 月，由国家杰出青年基金获得者徐富强研究员领导。综合不同层次和尺度的神经生物学的方法和技术是该实验室的显著特点。现已建立分子生物学、生物化学、神经环路示踪、微透析、电生理、光学成像、磁共振成像、动物行为等方法和技术，拟建立微观的分子/细胞水平研究与宏观的系统/行为研究之间的桥梁，以解决气味信息的编码机制以及重大神经疾病的神经环路基础等基本问题。目前，该实验室有 2 名助理研究员，2 名博士后，2 名实验师和 14 名研究生。其主要研究课题和方向为：嗅觉编码机制研究；生理状态调控气味感知的研究；嗅觉与老年痴呆病的相关研究；神经环路的病毒标记技术研究；嗅觉与饮食关系的研究等。本实验室已与耶鲁大学、普林斯顿大学、纽约大学、科罗拉多大学，北京生命科学研究所，中科院生物物理所、中科院昆明动物研究所、第二军医大学、华中科技大学、武汉大学、华中农业大学等国内外研究机构均已建立紧密的合作关系。

近期发表的主要文章有：

1. R. Gong, C. Ding, J. Hu, Y. Lu, F. Liu, E. Mann, **F. Xu**, MB. Cohen and M. Luo, Role for the Membrane Receptor Guanylyl Cyclase-C in Attention Deficiency and Hyperactive Behavior. *Science*, 333(6049):1642-6 (2011).
2. A. Li, L. Gong, **F. Xu***. Brain-state-independent neural representation of peripheral stimulation in olfactory bulb. *PNAS*, 108:5087-92 (2011).

网址：http://www.wipm.ac.cn/jgsz/yjdw/cigongzhenyingyong/shenjingyingxiang/yanjiuneirong/
地址：湖北省武汉市武昌区八一路小洪山西 30 号
邮编：430071

动 物 学 研 究 2012，Oct. 33(5): 537−541 CN 53-1040/Q ISSN 0254-5853
Zoological Research DOI：10.3724/SP.J.1141.2012.05537

髓系单核细胞来源的 HIV-1 限制性因子——SAMHD1

李佩璐, 陈倩倩, 张驰宇*

(江苏大学 生命科学研究院, 江苏 镇江 212013)

摘要：天然抗病毒限制因子是 HIV-1 研究最热点的领域。继 APOBEC3G、Trim5α、Tetherin 被发现之后, SAMHD1 于 2011 年被发现为新的抗 HIV-1 限制因子。它主要在髓系来源的单核细胞中表达, 如巨噬细胞和树突状细胞。该文对 SAMHD1 的结构、抗病毒机制、与 Vpx 的相互作用以及进化等方面的研究进行了综述。SAMHD1 的发现为深入研究 SAMHD1 在慢病毒致病机理中作用打开了一扇门。

关键词：SAMHD1; HIV-1; 髓系细胞; HIV-1 限制因子; Vpx
中图分类号：Q956; Q939.93 **文献标志码**：A **文章编号**：0254-5853-(2012)05-0537-05

SAMHD1— A HIV-1 restriction factor derived from myeloid lineage monocytes

LI Pei-Lu, CHEN Qian-Qian, ZHANG Chi-Yu*

(*Institute of Life Sciences*, *Jiangsu University*, *Zhenjiang Jiangsu* 212013, *China*)

Abstract: HIV-1 restriction factors have became one of the hottest fields of AIDS researches. In 2011, SAMHD1 was demonstrated to be a novel HIV-1 restriction factor, adding to a list of HIV-1 restriction factors that include APOBEC3G, TRIM5α and Tetherin. SAMHD1 is highly expressed in myeloid-lineage monocytes, such as macrophages and dendritic cells. In this paper, we review the current research progress on the structure of SAMHD1, its antiviral mechanism, interaction with the lentivirus Vpx, and evolution. The identification of SAMHD1 opens the door towards understanding the role of SAMHD1 in lentiviral pathogenesis.

Key words: SAMHD1; HIV-1; Myeloid cells; HIV-1 restriction factor; Vpx

巨噬细胞(macrophages)和树突状细胞(dendritic cells, DC)在病毒感染中起关键作用, 它们给病毒提供储存的场所, 在人类免疫缺陷病毒(HIV-1)感染细胞初期和病毒扩散中具有不可缺少的作用。HIV-1 可以在人类 T 细胞中正常复制, 但在树突状细胞、巨噬细胞等髓系单核细胞中复制水平很低。HIV-2 和 SIVsm(感染乌白眉猴的免疫缺陷病毒)可以在这些细胞中大量复制, 且不易导致宿主发病。HIV-1 和 HIV-2 在基因组水平的差异为 HIV-2 编码 Vpx 基因, 而 HIV-1 不编码 Vpx 基因, 意味着髓系单核细胞可能存在一种未知的限制因子来限制病毒复制, 但却被 Vpx 蛋白拮抗。

2011 年, 巨噬细胞及相关的 DC 细胞中存在的这种 HIV-1 限制性因子——SAMHD1(sterile α motif domain and HD domain-containing protein 1)被发现, 成为继 APOBEC3G (apolipo-protein messenger RNA-editing enzyme catalytic polypeptide-like editing complex 3)、Trim5α (tripartite motif 5 α)、Tetherin 后发现存在于灵长类动物中的第 4 种抗 HIV-1 限制性因子。SAMHD1 主要在髓系(myeloid-lineage)细胞中表达, 并且可以被 HIV-2 和 SIVsm 编码的 Vpx 蛋白拮抗。有趣的是, HIV-2 携带可以降解 SAMHD1 的 Vpx 基因, 而 HIV-1 和它的祖先病毒 SIVcpz(感染黑猩猩)的基因组却不编码 Vpx 基因。缺失 Vpx 好像有利于 HIV-1 逃逸在感染的髓系细胞中启动机体对病毒的免疫监视。

收稿日期：2012-04-28；接受日期：2012-08-27
基金项目：国家自然科学基金(81071391); 江苏省自然科学基金 (BK2011474)
*通信作者(Corresponding author)，Tex/Fax：0511-88791702, E-mail: zhangcy1999@hotmail.com
第一作者简介：李佩璐, 女, 硕士研究生, 研究方向为 HIV-1 限制性因子 SAMHD1 与 Vpx 的相互作用

1 SAMHD1 的发现与确认

SAMHD1 最初从人类 DC 细胞中被克隆，被认为是在巨噬细胞和 DC 细胞中具有先天性免疫功能的一个干扰素 γ 诱导的因子。SAMHD1 可以在包括 THP-1、初始的单核细胞、单核细胞来源的巨噬细胞、树突状细胞在内的非允许细胞中表达，而在 $CD4^+$T 细胞以及 U937 细胞中却不能表达(Hrecka et al, 2011; Laguette et al, 2011)。

在树突状细胞和巨噬细胞中存在一种限制 HIV-1 感染的因子，并且这种限制性作用能被 Vpx 所抵消(Goujon et al, 2007, 2008; Hirsch et al, 1998; Kaushik et al, 2009; Sharova et al, 2008)。Hrecka et al (2011)通过 western blotting 发现与 Vpx 结合的为一种称为 SAMHD1 的蛋白。Laguette et al (2011)使用 shRNA(short hairpin RNAs)沉默 THP-1 细胞中 SAMHD1 的表达后，明显增加了 HIV-1 对 THP-1 细胞的感染性。如果增加 THP-1 细胞内 SAMHD1 的表达水平，THP-1 细胞对 HIV-1 的限制性作用也会明显增强。当在转染了 SAMHD1 的 shRNA 的 THP-1 细胞中表达可以抵抗 shRNA 沉默效应的同义突变的 SAMHD1 基因后，就可以恢复 THP-1 细胞的 HIV-1 限制能力。在允许性细胞——U937 中表达 SAMHD1 后，发现突变型的 SAMHD1 失去对 HIV-1 的限制作用，而野生型的 SAMHD1 能够限制 HIV-1 对 U937 细胞的感染性 (Laguette et al, 2011)。Hrecka et al (2011)发现 HIV-2 及 SIVsm 表达的 Vpx 可以降解 SAMHD1，并解除巨噬细胞对慢病毒感染的抑制。也就是说，当 Vpx 存在时，SAMHD1 不能发挥对 HIV-1 的限制作用。当 Vpx 发生突变，其不能降解 SAMHD1，巨噬细胞中的 SAMHD1 将抑制 HIV-1 的感染(Laguette et al, 2011)。这些充分表明 SAMHD1 是新的抗 HIV-1 限制因子。

2 SAMHD1 蛋白结构

SAMHD1 蛋白(相对分子质量为 7.2×10^4)包括两个结构域，SAM(sterile alpha motif)结构域和 HD 结构域(图 1)。SAM 结构域包含 65~70 个氨基酸，参与蛋白-蛋白或蛋白-RNA 相互作用(Kim & Bowie, 2003)。HD 结构域包含一个含有两个组氨酸(His)和两个天冬氨酸(Asp)的高度保守基序(H...HD...D)，并且具有磷酸水解酶 (phosphohydrolase)活性，该活性对 SAMHD1 介导抑制 HIV-1 的感染起到关键作用(Laguette et al, 2011)。

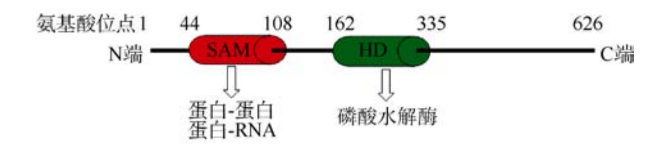


图 1 SAMHD1 结构

Fig. 1 The structure of SAMHD1

3 SAMHD1 的作用机制

SAMHD1 对 HIV-1 的复制具有明显的限制作用。为了探讨 SAMHD1 抑制 HIV-1 复制的机制，Laguette et al (2011)用实时定量 PCR 对细胞内的病毒 DNA 进行量化分析，发现 HIV-1 感染细胞后，在表达 SAMHD1 的细胞内病毒 DNA 的量只是 SAMHD1 被 shRNA 沉默后的 1/13。由此可以断定 SAMHD1 限制 HIV-1 的感染发生在逆转录阶段。

SAMHD1 具有磷酸水解酶活性。在体外，SAMHD1 在 dGTP 存在的情况下，能够降解所有四种 dNTPs。当缺乏 dGTP 时，其不能降解其他三种 dNTPs(Jermy, 2012)。SAMHD1 对 HIV-1 复制的限制是通过降解细胞内 dNTP 的水平(Goldstone et al, 2011; Powell et al, 2011)，使胞内 dNTPs 的水平低于病毒复制的需要水平，从而切断 HIV-1 逆转录所需底物的来源。 这一过程被称为“核苷酸仓库耗竭”。

4 SAMHD1 与 Vpx 的相互作用

Laguette et al (2011)通过对带有 FLAG 标记的 F/H-Vpx 蛋白进行免疫共沉淀证明灵长类慢病毒的 Vpx 蛋白可以与 SAMHD1 发生相互作用，并且这种相互作用具有物种特异性。当 Vpx 在 PMA(phorbol 12-myristate 13-acetate)诱导分化后的 THP-1 细胞中表达，细胞内 SAMHD1 水平明显降低，而用蛋白酶抑制剂 MG132 处理细胞后，细胞内 SAMHD1 的水平得到恢复(Laguette et al, 2011)。这表明 Vpx 可以诱导 SAMHD1 的蛋白酶体降解途径，并且 Vpx 降解 SAMHD1 的机制是通过加载 SAMHD1 到 $CRL4^{DCAF1}$E3 泛素蛋白连接酶上(Hrecka et al, 2011)（图 2）。

野生型的 Vpx 能有效降低巨噬细胞 SAMHD1 的水平。当 Vpx 的 76 位氨基酸发生 Q→A(Q76A)的突变，将失去与DCAF1 结合的能力，因而不能降低细胞内的 SAMHD1 的水平(Hrecka et al, 2011)。此外，实验证明，Vpx 的第 17 位氨基酸在 HIV-1 感染巨噬细胞和 DC 细胞中起重要的作用(Goujon et al, 2008)，意味着第 17 位氨基酸可能与 Vpx 介导的

SAMHD1 降解有关。Berger et al (2011)通过构建 Vpx T17A 突变体证实 Vpx T17A 突变体在细胞内表现出与野生型 Vpx 相同的细胞定位，但却不能降解 SAMHD1。

为了确定 SAMHD1 的哪个结构域参与 Vpx 介导 SAMHD1 降解, Ahn et al (2012)构建了 SAMHD1 N 端和 C 端的缺失突变体，然后通过 MSCV 载体在 U937 细胞中表达。结果发现 Vpx 可以介导 N 端缺失(113~626 氨基酸)的 SAMHD1 的降解。因为缺失的 N 端包含 SAM 结构域(图 1)，这表明 Vpx 与 SAMHD1 相互作用的靶位点不在 SAM 区。相反, Vpx 不能介导 C 端缺失(31 个氨基酸)的 SAMHD1 的降解，说明 SAMHD1 的 C 端对于 Vpx 介导的 SAMHD1 的降解是必需的。比较不同的脊椎动物的 SAMHD1 发现它们的差别主要集中在 C 端区。因此 SAMHD1 的 C 端区可能介导 Vpx 与 SAMHD1 和 CRL4^{DCAF1}E3 复合物的结合(Ahn et al, 2012)。此外，Ahn et al (2012)构建了 SAMHD1 的 L617A、LF620AA 变异体，发现变异后的 SAMHD1 可以拮抗 Vpx 诱导的降解。 这表明 R617, L620 和 F621 位点的氨基酸在 SAMHD1 与 DDB1-DCAF1c-Vpx 复合物结合中发挥重要作用(Ahn et al, 2012)。

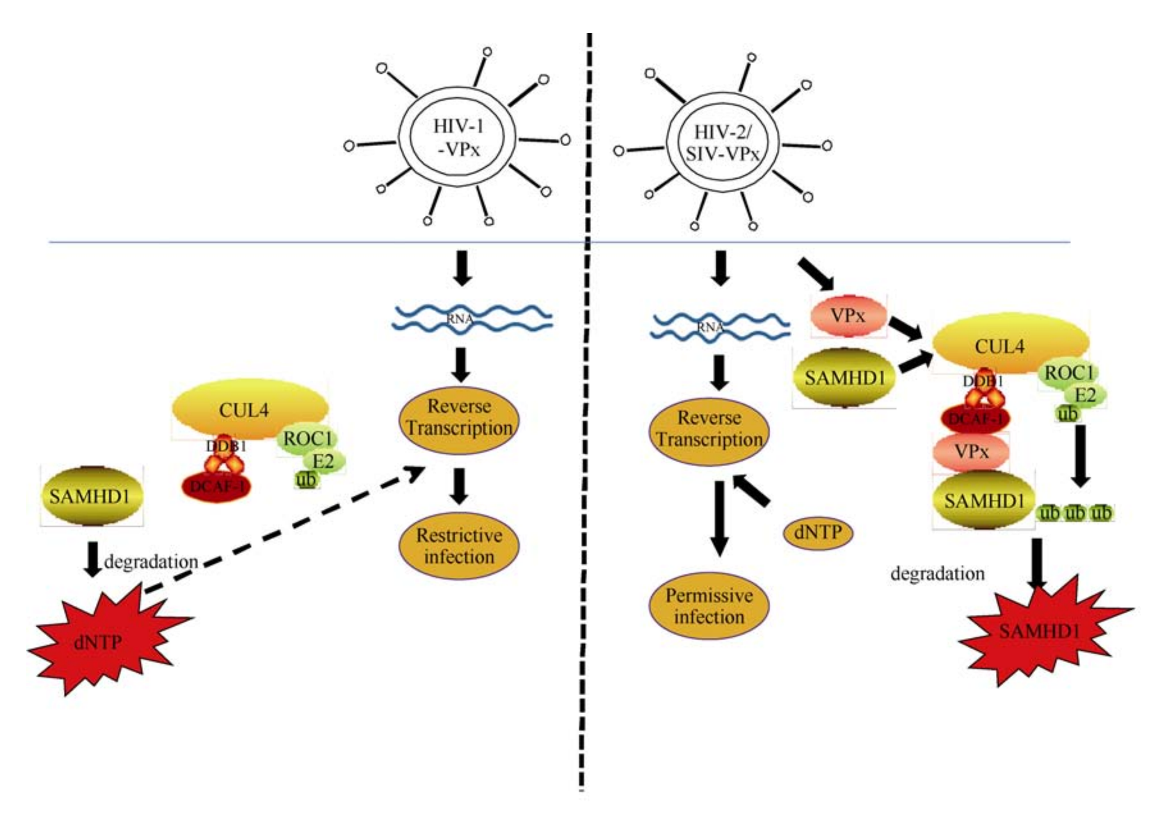


图 2　HIV-2/SIV 感染髓系细胞后 Vpx 与 E3 泛素连接酶相互作用从而降解限制性因子 SAMHD1 (修改自 Ayinde et al, 2010; St Gelais & Wu, 2011; Planelles, 2011)

Fig. 2　Vpx interacts with the E3 ubiquitin ligase complex to target the restriction factor SAMHD1 for proteasomal degradation (Adapted from Ayinde et al, 2010; St Gelais & Wu, 2011; Planelles, 2011).

5　SAMHD1 的进化

根据红色皇后假说，宿主的限制因子和病毒携带的拮抗蛋白处于进化的“军备竞赛”之中，都将受到正选择压力。之前研究已经证明 APOBEC3G、Trim5a、Tetherin 受到达尔文正选择 (Gupta et al, 2009; Liu et al, 2010; McNatt et al, 2009; Si et al, 2006; Zhang & Webb, 2004)。作为抗病毒限制因子家族的一员, SAMHD1 应该也受到达尔文正选择压力。

Lim et al (2012)比较了灵长类动物 SAMHD1 蛋白的进化速度，发现 SAMHD1 蛋白的快速进化发生在 2 300 万年前，之后关于 SAMHD1 蛋白快速进化的证据非常少。相反，可被携带 Vpr/Vpx 的慢病毒感染的旧大陆猴(old world monkey)的 SAMHD1 蛋白却在百万年来一直经历快速进化。结合慢病毒感染灵长类已有百万年的历史，表明 SAMHD1 的

选择压力可能来自于灵长类慢病毒。Zhang et al (2012)对 7 个灵长类物种的 SAMHD1 进化分析, 发现人类、黑猩猩和大猩猩的 SAMHD1 基因不受正选择压力, 也检测不到正选择位点, 而其它 4 个灵长类物种 Orangutan、Gibbon、Rhesus macaque、Marmoset 的 SAMHD1 基因受到正选择, 且鉴定了 9 个正选择位点。人类、黑猩猩和大猩猩分别是不编码 Vpx 基因的 HIV-1、SIVcpz、SIVgor 的自然宿主, 而其他 4 个灵长类物种可以被编码 Vpx 的 SIV 支系感染。 这些结果进一步证明 SAMHD1 的选择压力来自于灵长类慢病毒的 Vpx 基因(Zhang et al, 2012)。

Lim et al (2012)对 SAMHD1 的氨基酸位点进行正选择分析, 发现旧大陆猴的 SAMHD1 具有明显的正选择, 同时发现 N 端的 32、36 位点, SAM 区的 46、69、107 位点, C 端的 486 位点对 SAMHD1 的功能有重要的影响，并且点突变实验表明, 46、69 位的 SAMHD1 点突变体可以影响 Vpx 对 SAMHD1 的降解能力。

6 SAMHD1 相关疾病

SAMHD1 的基因多态性与一种罕见的称为 AGS(Aicardi-Goutie'res syndrome)的类似于先天病毒感染的自身免疫疾病相关(Crow & Rehwinkel, 2009; Rice et al, 2009)。 这种疾病 1984 年被 Jean Aicardi 和 Francoise Gouti`eres 所发现(Aicardi & Goutieres, 1984)。当 SAMHD1 的 123、143、145、201、209、254、369、385 位氨基酸发生突变, 则会导致 AGS。 AGS 的发生归咎于在病毒缺席时, 免疫系统内干扰素的不适当诱导。SAMHD1 和其他引发 AGS 的细胞蛋白能摒弃细胞的核酸碎片, 预防这种干扰素系统被不适当地激活。来自 AGS 病人的 $CD14^+$细胞对 HIV-1 感染敏感, 而来自正常人的 $CD14^+$细胞对 HIV-1 感染不敏感, 这可能是因为髓系细胞缺乏内源性 SAMHD1, 无法限制 HIV-1 的感染(Berger et al, 2011)。此外, 在 SAMHD1 的单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphisms, SNPs)位点中, SNP 位点 rs1291142 可以显著降低 SAMHD1 mRNA 的表达水平(Coon et al, 2012)。然而, 包括 rs1291142 在内, SAMHD1 的 SNPs 与欧洲人和非裔美国人的 HIV-1 感染状态没有任何相关性(Coon et al, 2012)。

7 展 望

在 HIV-1 感染过程中, 病毒的辅助蛋白不仅参与病毒有效复制, 而且可以拮抗宿主细胞中的天然抗病毒限制因子, 使病毒逃逸宿主的免疫监视。髓系细胞中限制因子 SAMHD1 的发现为深入了解 SAMHD1 在慢病毒致病机制中扮演的角色打开了一扇门。HIV-2 及某些 SIV 编码 Vpx, SAMHD1 可以被 Vpx 蛋白拮抗, 而 HIV-1 及其祖先 SIVcpz 却不编码 Vpx 基因, 根据 Zhang et al (2012)的研究, HIV-1 及其祖先不编码 Vpx 的原因是, 早期的 SIVcpz 在感染黑猩猩的过程中丢失了 Vpx 基因, 丢失过程可能与重组有关。某些古老的 SIV 同时编码 Vpr 和 Vpx, 其 Vpx 不能降解 SAMHD1, 而 Vpr 可以种属特异性地降解相应的灵长类 SAMHD1。更古老的 SIV 支系如 SIVolc 和 SIVwrc 编码的 Vpr 却不能降解 SAMHD1。Vpx 与 Vpr 在氨基酸水平具有很高的相似性, Vpr 是在 SIV 进化过程中获得了降解 SAMHD1 的新功能, 之后, 通过基因重复产生了 Vpx(Lim et al, 2012; Tristem et al, 1992)。然而, 有些灵长类慢病毒如 SIVmac, SIVsmm 等编码可以降解 SAMHD1 的 Vpx, 但是其编码的 Vpr 却不能降解 SAMHD1, 似乎不支持 Vpx 起源自 Vpr 基因重复的结论。灵长类慢病毒 Vpx 如何起源仍值得进一步研究。

参考文献：

Ahn J, Hao C, Yan JP, Delucia M, Meherns J, Wang CP, Gronenborn AM, Skowronski J. 2012. HIV/SIV accessory virulence factor Vpx loads the host cell restriction factor SAMHD1 onto the E3 ubiquitin ligase complex $CRL4^{DCAF1}$ [J]. *J Biol Chem,* **287**(15): 12550-12558.

Aicardi J, Goutières F. 1984. A progressive familial encephalopathy in infancy with calcifications of the basal ganglia and chronic cerebrospinal fluid lymphocytosis [J]. *Ann Neurol,* **15**(1): 49-54.

Ayinde D, Maudet C, Transy C, Margottin-Goguet F. 2010. Limelight on two HIV/SIV accessory proteins in macrophage infection: is Vpx overshadowing Vpr? [J]. *Retrovirology,* **7**: 35.

Berger A, Sommer AFR, Zwarg J, Hamdorf M, Welzel K, Esly N, Panitz S, Reuter A, Ramos I, Jatiani A, Mulder LCF, Fernandez-Sesma A, Rutsch F, Simon V, König R, Flory E. 2011. SAMHD1-deficient CD14+ cells from individuals with Aicardi-Goutières syndrome are highly susceptible to HIV-1 infection [J]. *PLoS Pathog,* 7: e1002425.

Coon S, Wang DX, Wu L. 2012. Polymorphisms of the SAMHD1 gene are not associated with the infection and natural control of HIV-1 in Europeans and African Americans [J]. *AIDS Res Hum Retroviruses* [Epub ahead of print]

Crow YJ, Rehwinkel J. 2009. Aicardi-Goutieres syndrome and related

phenotypes: linking nucleic acid metabolism with autoimmunity [J]. *Hum Mol Genet,* 18(R2): R130-R136.

Evans DT, Serra-Moreno R, Singh RK, Guatelli JC. 2010. BST-2/tetherin: a new component of the innate immune response to enveloped viruses [J]. *Trends Microbiol,* **18**(9): 388-396.

Goldstone DC, Ennis-Adeniran V, Hedden JJ, Groom HCT, Rice GI, Christodoulou E, Walker PA, Kelly G, Haire LF, Yap MW, de Carvalho LPS, Stoye JP, Crow YJ, Taylor IA, Webb M. 2011. HIV-1 restriction factor SAMHD1 is a deoxynucleoside triphosphate triphosphohydrolase [J]. *Nature,* **480**(7377): 379-382.

Goujon C, Arfi V, Pertel T, Luban J, Lienard J, Rigal D, Darlix JL, Cimarelli A. 2008. Characterization of simian immunodeficiency virus SIVSM/human immunodeficiency virus type 2 Vpx function in human myeloid cells [J]. J Virol, 82(24): 12335-12345.

Goujon C, Rivière L, Jarrosson-Wuilleme L, Bernaud J, Rigal D, Darlix JL, Cimarelli A. 2007. SIV_{SM}/HIV-2 Vpx proteins promote retroviral escape from a proteasome-dependent restriction pathway present in human dendritic cells [J]. *Retrovirology,* **4**: 2.

Gupta RK, Hue S, Schaller T, Verschoor E, Pillay D, Towers GJ. 2009. Mutation of a single residue renders human tetherin resistant to HIV-1 Vpu-mediated depletion [J]. *PLoS Pathog,* **5**: e1000443.

Harris RS, Liddament MT. 2004. Retroviral restriction by APOBEC proteins [J]. *Nat Rev Immunol,* **4**(11): 868-877.

Hirsch VM, Sharkey ME, Brown CR, Brichacek B, Goldstein S, Wakefield J, Byrum R, Elkins WR, Hahn BH, Lifson JD, Stevenson M. 1998. Vpx is required for dissemination and pathogenesis of SIV_{SM} PBj: evidence of macrophage-dependent viral amplification [J]. *Nat Med,* **4**(12): 1401-1408.

Hrecka K, Hao CL, Gierszewska M, Swanson SK, Kesik-Brodacka M, Srivastava S, Florens L, Washburn MP, Skowronski J. 2011. Vpx relieves inhibition of HIV-1 infection of macrophages mediated by the SAMHD1 protein [J]. *Nature,* **474**(7353): 658-661.

Jermy A. 2012. Viral infection: SAMHD1 cuts the power to HIV-1 [J]. *Nat Rev Microbiol,* **10**(4): 237.

Kaushik R, Zhu XN, Stranska R, Wu YF, Stevenson M. 2009. A cellular restriction dictates the permissivity of nondividing monocytes/ macrophages to lentivirus and gammaretrovirus infection [J]. *Cell Host Microbe,* **6**(1): 68-80.

Kim CA, Bowie JU. 2003. SAM domains: uniform structure, diversity of function [J]. *Trends Biochem Sci,* **28**(12): 625-628.

Laguette N, Rahm N, Sobhian B, Chable-Bessia C, Münch J, Snoeck J, Sauter D, Switzer WM, Heneine W, Kirchhoff F, Delsuc F, Telenti A, Benkirane M. 2012. Evolutionary and functional analyses of the interaction between the myeloid restriction factor SAMHD1 and the lentiviral Vpx protein [J]. *Cell Host Microbe,* **11**(2): 205-217.

Laguette N, Sobhian B, Casartelli N, Ringeard M, Chable-Bessia C, Ségéral E, Yatim A, Emiliani S, Schwartz O, Benkirane M. 2011. SAMHD1 is the dendritic- and myeloid-cell-specific HIV-1 restriction factor counteracted by Vpx [J]. *Nature,* **474**(7353): 654-657.

Li N, Zhang WP, Cao XT. 2000. Identification of human homologue of mouse IFN-gamma induced protein from human dendritic cells [J]. *Immunol Lett,* **74**(3): 221-224.

Lim ES, Fregoso OI, McCoy CO, Matsen FA, Malik HS, Emerman M. 2012. The ability of primate lentiviruses to degrade the monocyte restriction factor SAMHD1 preceded the birth of the viral accessory protein Vpx [J]. *Cell Host Microbe,* **11**(2): 194-204.

Liu J, Chen KP, Wang JH, Zhang CY. 2010. Molecular evolution of the primate antiviral restriction factor tetherin [J]. *PLoS ONE,* **5**(7): e11904.

McNatt MW, Zang T, Hatziioannou T, Bartlett M, Fofana IB, Johnson WE, Neil SJD, Bieniasz PD. 2009. Species-specific activity of HIV-1 Vpu and positive selection of tetherin transmembrane domain variants [J]. *PLoS Pathog,* **5**(2): e1000300.

Planelles V. 2011. Restricted access to myeloid cells explained [J]. *Viruses,* **3**(9): 1624-1633.

Planelles V. 2012. SAMHD1 Joins the red Queen's court [J]. *Cell Host Microbe,* **11**(2): 103-105.

Powell RD, Holland PJ, Hollis T, Perrino FW. 2011. Aicardi-Goutières syndrome gene and HIV-1 restriction factor SAMHD1 is a dGTP-regulated deoxynucleotide triphosphohydrolase [J]. *J Biol Chem,* **286**(51): 43596-43600.

Rice GI, Bond J, Asipu A, Brunette RL, Manfield IW, Carr IM, Fuller JC, Jackson RM, Lamb T, Briggs TA, Ali M, Gornall H, Couthard LR, Aeby A, Attard-Montalto SP, Bertini E, Bodemer C, Brockmann K, Brueton LA, Corry PC, Desguerre I, Fazzi E, Cazorla AG, Gener B, Hamel BCJ, Heiberg A, Hunter M, van der Knaap MS, Kumar R, Lagae L, Landrieu PG, Lourenco CM, Marom D, McDermott MF, van der Merwe W, Orcesi S, Prendiville JS, Rasmussen M, Shalev SA, Soler DM, Shinawi M, Spiegel R, Tan TY, Vanderver A, Wakeling EL, Wassmer E, Whittaker E, Lebon P, Stetson DB, Bonthron DT, Crow YJ. 2009. Mutations involved in Aicardi-Goutieres syndrome implicate SAMHD1 as regulator of the innate immune response [J]. *Nat Genet,* **41**(7): 829-832.

Sharova N, Wu YF, Zhu XN, Stranska R, Kaushik R, Sharkey M, Stevenson M. 2008. Primate lentiviral Vpx commandeers DDB1 to counteract a macrophage restriction [J]. *PLoS Pathog,* **4**(5): e1000057.

Si ZH, Vandegraaff N, O'Huigin C, Song B, Yuan W, Xu C, Perron M, Li X, Marasco WA, Engelman A, Dean M, Sodroski J. 2006. Evolution of a cytoplasmic tripartite motif (TRIM) protein in cows that restricts retroviral infection [J]. *Proc Natl Acad Sci USA,* **103**(19): 7454-7459.

St Gelais C, Wu L. 2011. SAMHD1: a new insight into HIV-1 restriction in myeloid cells [J]. Retrovirology, **8**(1): 55.

Tristem M, Marshall C, Karpas A, Hill F. 1992. Evolution of the primate lentiviruses: evidence from vpx and vpr [J]. *EMBO J,* **11**(9): 3405-3412.

Worobey M, Telfer P, Souquiere S, Hunter M, Coleman CA, Metzger MJ, Reed P, Makuwa M, Hearn G, Honarvar S, Roques P, Apetrei C, Kazanji M, Marx PA. 2010. Island biogeography reveals the deep history of SIV [J]. *Science,* **329**(5998): 1487.

Zhang JZ, Webb DM. 2004. Rapid evolution of primate antiviral enzyme APOBEC3G [J]. *Hum Mol Genet,* **13**(16): 1785-1791.

Zhang CY, de Silva S, Wang JH, Wu L. 2012 .Co-evolution of primate SAMHD1 and lentivirus Vpx leads to the loss of the vpx gene in HIV-1 ancestor [J]. *PLoS ONE,* **7**(5): e37477.

动 物 学 研 究 2012，Oct. 33(5): 542−544　　CN 53-1040/Q　ISSN 0254-5853
Zoological Research　　DOI：10.3724/SP.J.1141.2012.05542

中国兽类鼩鼱科一新纪录——高氏缺齿鼩

何 锴[1], 邓 可[2], 蒋学龙[1,*]

(1. 中国科学院昆明动物研究所 遗传与进化国家重点实验室，云南 昆明 650223; 2. 西南林业大学 生命科学学院，云南 昆明 650224)

摘要：2011 年 12 月 5 日在云南省个旧市蔓耗镇（N23°00′43.0″, E103°26′18.9″, 海拔 350 m）采集到高氏缺齿鼩（*Chodsigoa caovansunga* Lunde, Musser and Son, 2003）标本 1 号。该物种为中国新纪录并且是其在模式产地（越南河江省 Mt. Tay Con Linh II 山）以外的首个分布纪录。该标本头体长、尾长及颅全长明显大于模式产地的标本, 线粒体 cyt-*b* 序列（JX508288）与地模标本相似度为 98.6%。采集地生境为沟谷雨林, 干扰类型为香蕉种植。

关键词：高氏缺齿鼩; 新纪录; 动物地理
中图分类号：Q959.8　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：0254-5853-(2012)05-0542-03

First record of Van sung's shrew (*Chodsigoa caovansunga*) in China

HE Kai[1], DENG Ke[2], JIANG Xue-Long[1,*]

(1. *State Key Laboratory of Genetic Resources and Evolution*, *Kunming Institute of Zoology*, *Chinese Academy of Sciences*, *Kunming* 650223, *China*;
2. *Life Science College*, *Southwest Forestry University*, *Kunming* 650224, *China*)

Abstract: On December 5, 2012, a specimen of *Chodsigoa caovansunga* Lunde, Musser and Son, 2003 was collected at Manhao, Gejiu, Yunnan (N23°00′43.0″, E103°26′18.9″, 350 m asl). This finding is the first recorded distribution of *C. caovansunga* in China and outside of the type locality (Mt. Tay Con Linh II, Ha Giang, Vietnam). The length of the head, body, tail and condylo-incisive are longer than those of the specimens from type locality in Vietnam, indicating a generally larger size. Likewise, the cyt-*b* sequence (GenBank accession number: JX508288) is 98.6% similar to specimens from type locality. The habitat of collection site was a ravine rain forest with banana plantation nearby.

Key words: *Chodsigoa caovansunga*; First record; Zoogeography

2011 年 12 月 5 日,中国科学院昆明动物研究所兽类考察组在云南个旧市蔓耗镇（N23°00′, E103°26′）使用 Sherman 在海拔 350 m 处捕获鼩鼱科标本 1 号。经形态与分子鉴定, 此标本为高氏缺齿鼩(*Chodsigoa caovansunga*), 且该物种此前仅在其模式产地(越南河江省 Mt. Tay Con Linh II 山)有分布纪录。该标本(KIZ 027112)皮张、头骨和组织样品目前馆藏于中国科学院昆明动物研究所标本馆。

1 形态特征

该标本为雌性个体。背毛灰褐色, 腹毛淡灰色; 尾、背及腹异色, 背部近黑色, 腹部奶白色, 具乳头三对; 尾尖无簇毛, 尾长为头体长的～110%; 后足呈褐色及奶白色, 且足底及掌外侧垫小而聚集(图 1)。外形及头骨量度如下：体重(weight) 6.2 g、头体长(head-body length) 74 mm、尾长(tail length) 83 mm、后足长(hind foot length) 15 mm、耳长(ear length) 9 mm、颅全长(condylo-incisive length) 18.8 mm、腭长(palato-incisor length) 8.31 mm、脑颅宽(cranial breadth) 8.76 mm、眶间距(interorbital breadth) 4.56 mm、吻宽(rostral breadth) 5.37 mm、上颌第二臼齿外宽(M^2-M^2 breadth) 5.26 mm、上颌齿列长(upper toothrow length) 7.83 mm、下齿列长(lower toothrow length) 7.39 mm(图 2)。相关头骨量度参照 Jiang & Hoffmann (2001)。

收稿日期：2012-08-07；接受日期：2012-08-23
基金项目：Special Support for Taxonomy by the Chinese Academy of Sciences (KSCXZ-YW-Z-0923)；National Natural Science Foundation of China (30370193)；Forestry Bureau, Honghe Hani and Yi Autonomous Prefecture, Yunnan
*通信作者(Corresponding author)，E-mail: JiangXL@mail.kiz.ac.cn



图 1　云南个旧高氏缺齿鼩标本的背面、后足腹面以及尾尖形态视图

Fig. 1　Specimen of *Chodsigoa caovansunga* from Gejiu, Yunnan in dorsal view, ventral views of hindfoot and dorsal view of tail tip

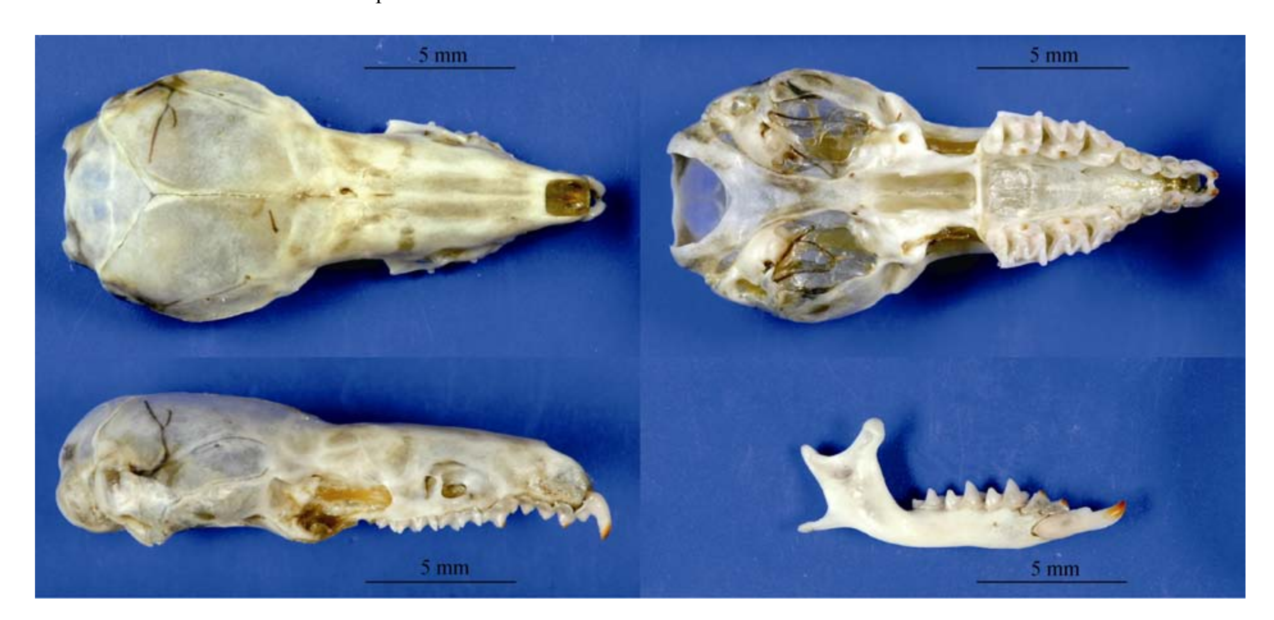


图 2　云南个旧高氏缺齿鼩的上颌骨背面、腹面和侧面观以及下颌骨侧面观

Fig. 2　Dorsal, ventral, lateral views of the cranium, and lateral view of the mandible of the specimen of *Chodsigoa caovansunga* from Gejiu, Yunnan.

2　遗传分析

该标本的线粒体 cyt-*b* 基因序列分析方法依照 He et al (2010)，序列已提交至 GenBank (Accession Number: JX508288)。通过 BLASTN (Zhang et al, 2000)进行序列比对发现该序列与 *C. caovansunga* 地模标本的序列 (AB175104)遗传差异为 1.4% (*P*-distance)。下载 GenBank 中其它高氏缺齿鼩以及同属其它物种(*C. hypsibia*, *C. sodalis* 和 *C. parca*)的 cyt-*b* 序列，并使用 MEGA5 (Tamura et al, 2011)构建 NJ 树，结果显著支持云南个旧的高氏缺齿鼩与越南北部的高氏缺齿鼩为姐妹群(支持率＝97；图 3)。

3　讨　论

此次在云南个旧采获的标本虽然体型偏大，但其头骨扁平、尾背腹异色、尾尖无簇毛以及后足

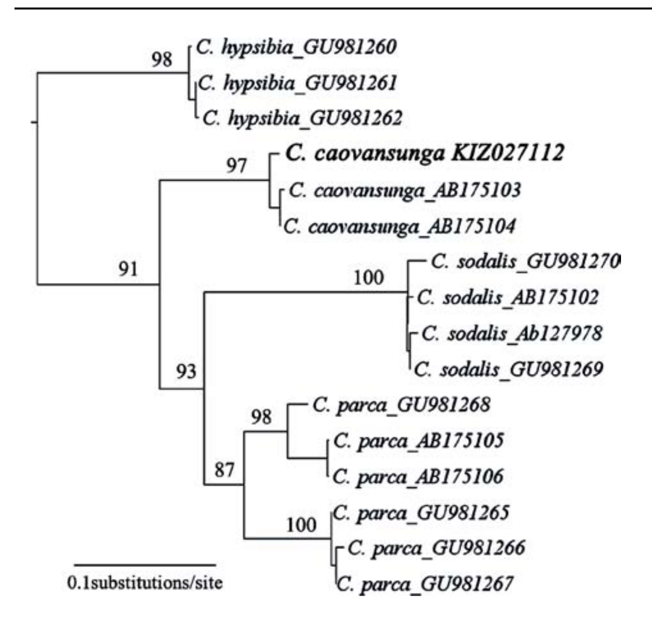


图 3 基于线粒体 cyt-*b* 基因的 NJ 树, 节点上的数值为自展重抽样 1 000 次得到的支持率

Fig. 3 NJ tree based on mitochondrial cyt-*b* gene. Numbers at the nodes represent bootstrap values based on 1000 replicates.

足底和掌外侧垫小而聚集的特征与物种的原始描记吻合 (Lunde et al, 2003), 且其 cyt-*b* 序列与地模标本的相似度为 98.6%，并构成单系群,以上的证据均表明该标本确系高氏缺齿鼩 (*Chodsigoa caovansunga*)。

高氏缺齿鼩首次于 2003 年记录于越南北部河江省 (Lunde et al, 2003), 并以越南学者高文充(Cao Van Sung)名字命名。由于发现时间较短, 迄今为止已知该物种的分布仅限于模式产地 Tay Con Linh II 山 (Lunde 2008)。因此本次采集到高氏缺齿鼩标本不仅是中国新纪录, 也是其在模式产地以外的首个分布纪录。

Lunde et al (2003)采集的标本分布于海拔 1 300～2 000 m 之间的亚热带常绿阔叶林, 因此他们推断该物种还可能分布于越南北部以及中国西南山地森林中。本次考察采集到的标本位于云南南部, 接近越南边境, 但采集地海拔仅 350 m, 较模式产地低～1 000 m, 且栖息地为沟谷雨林, 附近种植有香蕉。在这一海拔带上, 除川西短尾鼩 (*Anourosorex squamipes*) 和喜马拉雅水鼩 (*Chimarrogale himalayica*)之外, 很少有其它鼩鼱亚科(Soricinae)物种分布。在地理上该标本采集地与模式产地相距不远, 但是其海拔分布与栖息地类型有较大差异, 因此该标本的采集对于该类群的进一步研究具有特别意义。

此外, 在云南个旧采集的标本体型大于越南模式产地的标本, 越南标本(*n*=12)头体长(60.4±1.8) mm (58～64 mm), 尾长 58.3±3.9 mm (51～68 mm), 颅全长 17.7±0.3 mm (17.3～18.4 mm)(Lunde et al, 2003)。因此, 基于采集地海拔、栖息地、体型大小以及 cyt-*b* 序列差异, 云南个旧的高氏缺齿鼩或许已经与越南种群发生了隔离分化, 但这还需要更多的证据及标本加以证实。

参考文献:

He K, Li YJ, Brandley MC, Lin LK, Wang YX, Zhang YP, Jiang XL. 2010. A multi-locus phylogeny of Nectogalini shrews and influences of the paleoclimate on speciation and evolution [J]. *Mol Phylogenet Evol*, **56**(2): 734-746.

Jiang XL, Hoffmann RS. 2001. A revision of the white-toothed shrews (*Crocidura*) of Southern China [J]. *J Mammal*, **82**(4): 1059-1079.

Lunde DP, Musser GG, Son NT. 2003. A survey of small mammals from Mt. Tay Con Linh II, Vietnam, with the description of a new species of Chodsigoa (Insectivora: Soricidae) [J]. *Mamm Study*, **28**(1): 31-46.

Lunde DP. 2008. *Chodsigoa caovansunga*. In: IUCN 2012. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2012. 1. <www.iucnredlist.org>.

Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods [J]. *Mol Biol Evol*, **28**(10): 2731-2739.

Zhang Z, Schwartz S, Wagner L, Miller W. 2000. A greedy algorithm for aligning DNA sequences [J]. *J Comput Biol*, **7**(1-2): 203-214.

动 物 学 研 究 2012，Oct. 33(5): 545−546 CN 53-1040/Q ISSN 0254-5853
Zoological Research DOI：10.3724/SP.J.1141.2012.05545

中国鸟类鸻科新纪录种——白尾麦鸡

丁进清, 马 鸣*

(中国科学院新疆生态与地理研究所, 新疆 乌鲁木齐 830011)

摘要：2012 年 8 月 15 日在新疆南部莎车县东方红水库(38°26’N, 77°07’E, 海拔 1230 m), 当地摄影爱好者拍摄到一种奇特的长腿鸟, 经过查阅文献并鉴定, 确认该物种为中国鸟类新纪录种——白尾麦鸡 (*Vanellus leucurus*)。

关键词：白尾麦鸡; 新纪录; 莎车; 新疆; 中国
中图分类号：Q959.7+27 **文献标志码**：A **文章编号**：0254-5853-(2012)05-0545-02

White-tailed Lapwing *Vanellus leucurus*—A newly recorded of bird in China

DING Jin-Qing, MA Ming*

(*Xinjiang Institute of Ecology and Geography, the Chinese Academy of Sciences, Urumqi 830011, China*)

Abstract: On August 15, 2012, a local photographer recorded a new species, the White-tailed Lapwing (*Vanellus leucurus*) in the Dongfanghong Reservoir, 38 °26'N and 77 °07'E, altitude 1230 m, Yarkand County, in southern Xinjiang, China.

Key words: White-tailed Lapwing; *Vanellus leucurus*; New bird record; Yarkand; Xinjiang; China

2012 年 8 月 15 日下午, 在新疆南部莎车县东方红水库 (38°26’N, 77°07’E, 海拔 1230 m), 拍摄到一只麦鸡属 (*Vanellu*)鸟类, 经过查阅文献并鉴定, 确定为中国鸟类新纪录种——白尾麦鸡 (*Vanellus leucurus*)。

分类：白尾麦鸡为中型涉禽, 隶属于鸟纲鸻形目鸻科麦鸡属。模式产地在土耳其斯坦(Turkestan), 定名人为 Lichtenstein(1823)。为单型种, 没有亚种分化(del Hoyo et al,1996)。

形态：白尾麦鸡体长 260~290 mm, 嘴峰 26~32 mm, 体重 99~198 g。雌雄相似, 嘴黑色, 头、上体和前胸烟褐色, 前额、颏、喉、下体为白色。比较修长的腿呈鲜艳的黄色, 飞行时脚伸出尾部。尾纯白色, 初级飞羽黑色, 次级飞羽和翼上覆羽白色, 在翼上形成明显的白色宽带; 翼下覆羽灰白色。

分布：白尾麦鸡繁殖于哈萨克斯坦、乌兹别克斯坦、土库曼斯坦, 以及阿富汗、伊朗、伊拉克、叙利亚、约旦、土耳其、阿塞拜疆等; 越冬于非洲东南部、巴基斯坦、尼泊尔、孟加拉和印度西北部。迁徙期也见于中东和欧洲西部(Hayman et al, 1986)。根据拍摄时间和分布分析, 该鸟在新疆应属于旅鸟或夏候鸟。

栖息地及行为描述：莎车位于帕米尔高原以东、昆仑山南麓、塔克拉玛干沙漠西缘、叶尔羌河(Yarkant River)的下游。这里的湿地面积比较大, 有数千亩芦苇、滩地, 周围有沙丘。记录点距离国境线约 180 km, 是中亚候鸟迁徙的重要驿站。据观察, 白尾麦鸡喜单独活动, 不与其他鸟儿合群。在浅水滩中觅食, 主要吃水中的软体动物、小鱼、河虾, 也喜食甲虫、蝗虫、蝇蛆、蚯蚓等。一边觅食还不停地抬头观望, 对来人有警惕性, 稍有动静便立即飞开。傍晚喜欢在水边梳理羽毛。附近活动的水鸟有小苇鳽(*Ixobrychus minutus*)、夜鹭(*Nycticorax nycticorax*)、凤头麦鸡(*Vanellus vanellus*)、金鸻

收稿日期：2012-08-23；接受日期：2012-09-12
基金项目：国家自然科学基金(30970340; 31272291)；香港观鸟会中国自然保育基金
*通信作者(Corresponding author)，E-mail: maming@ms.xjb.ac.cn; maming3211@sina.com；maming3211@yahoo.com



图 1　在新疆莎车县首次发现中国鸟类新纪录——白尾麦鸡（*Vanellus leucurus*)(丁进清 摄)

Fig. 1 A newly recorded species of bird, the White-tailed Lapwing (*Vanellus leucurus*), from Yarkand County, southern Xinjiang, China (Photo by DING Jin-Qing)

(*Pluvialis fulva*)、黑翅长脚鹬(*Himantopus himantopus*)、青脚鹬(*Tringa nebularia*)、黑尾塍鹬(*Limosa limosa*)、红嘴鸥(*Larus ridibundus*)、燕鸥(*Sterna hirundo*)等。

参考文献：

del Hoyo J, Elliott A, Sargatal J. 1996. Handbook of the Birds of the World. Vol. 3[M]. Barcelona: Lynx Edicions.

Hayman P, Marchant J, Prater T. 1986. Shorebirds [M]. London: Christopher Helm.

Zheng GM. 2002. A Checklist on the Classification and Distribution of the Birds of the World [M]. Beijing: Science Press. [郑光美. 2002. 世界鸟类分类与分布名录. 北京：科学出版社.]

Zheng GM. 2011. A Checklis on the Classification and Distribution of the Birds of China [M]．Beijing: Science Press, 1-456. [郑光美. 2011. 中国鸟类分类与分布名录. 北京：科学出版社, 1-456.]

Zheng ZX. 2000. A Complete Checklist of Species and Subspecies of the Chinese Birds [M]. Beijing: Science Press, 1-322. [郑作新. 2000. 中国鸟类种和亚种分类名录大全. 北京：科学出版社, 1-322.]



DONGWUXUE YANJIU

双月刊(双月8日出版)，1980年创刊

Bimonthly, Since 1980

第33卷第5期，Vol.33 No.5

ZOOLOGICAL RESEARCH

编　　辑　《动物学研究》编辑部

[650223　昆明市教场东路32号　中国科学院昆明动物研究所　电话：(0871)5199026　传真：(0871)5113532　zoores@mail.kiz.ac.cn]

主　　编　姚永刚

主办单位　中国科学院昆明动物研究所　中国动物学会©

主管单位　中国科学院

出版单位　科学出版社(北京东黄城根北街16号　邮编100717)

印刷装订　昆明小松制版印刷有限公司(昆明市北京路402号建设大厦15楼　邮编650031)

国内总发行　云南省邮政公司报刊发行局（昆明市吴井路139号　邮编650011）

订　购　处　全国各地邮政局

国外总发行　中国国际图书贸易总公司（中国国际书店）(北京399信箱　邮编100044)

广告经营许可证：滇工商广字66号

Edited by Editorial Office of Zoological Research

(Kunming Institute of Zoology, the Chinese Academy of Sciences, 32 Jiaochang Donglu, Kunming, Yunnan, Post Code: 650223　Tel: +86 871 5199026　Fax: +86 871 5113532

E-mail: zoores@mail.kiz.ac.cn　Website: http://www.zoores.ac.cn)

Editor-in-Chief: YAO Yong-Gang

Sponsored by Kunming Institute of Zoology, the Chinese Academy of Sciences; China Zoological Society©

Published by Science Press (16 Donghuangchenggen Beijie, Beijing 100717, China)

Printed by Kunming Xiaosong Plate Making & Printing Co, Ltd

Subscribed to all local post offices in China

Domestic distributed by Yunnan Post

International distributed: China International Book Trading Corporation (Guoji Shudian) P.O.BOX 399, Beijing 100044, China

国内外公开发行　刊号：ISSN 0254-5853 / CN 53-1040/Q

国内邮发代号：64−20　国外发行代号：BM358

定价：￥40.00　　Post No：BM358

动物学研究（DONGWUXUE YANJIU）

第 33 卷第 5 期　　2012 年 10 月

目　次

研究论文

西双版纳食果鸟对植物果实颜色的取食选择 …… 段　琼, 权锐昌 (427)
广西弄岗穗鹛不同季节的觅食地选择 ……杨　岗, 陆　舟, 余辰星, 蒋爱伍, 蒙渊君, 周　放 (433)
千岛湖两栖爬行类动物群落结构嵌套分析 …… 王　熙, 王彦平, 丁　平 (439)
白蜡虫若虫口器超微结构特征与生态适应性 ……赵杰军, 陈晓鸣, 王自力, 叶寿德, 陈　勇, 王绍云 (447)
鸡 mir-17-92 基因簇的结构、功能及其调控 …… 闫晓红, 王志鹏, 王　宁 (455)
鲫属鱼类 DNA 条码及种与亚种划分 …… 程　磊, 常玉梅, 鲁翠云, 曹顶臣, 孙效文 (463)
黄河裸裂尻鱼肌肉生长抑制素基因克隆及表达分析……
……晁　燕, 赵兰英, 李长忠, 谢保胜, 申志新, 王国杰, 王振刚, 李　超, 拜彬强, 张　辉, 祁得林 (473)
花鲈 Wap65-2 基因的克隆、理化性质及其表达与哈维氏弧菌感染的相关性 ……
……史雨红, 陈　炯, 高姗姗, 沈广强, 陆新江, 李明云 (481)
中华卵索线虫雌雄寄生后期幼虫基因差异表达分析…… 吴运梅, 张丽红, 王国秀 (487)
联体小鼠在联体状态下的生理变化 ……张富祥, 杨亦彬, 柯贵宝, 陈　颖, 徐鑫梅, 谭州科, 容　松 (493)
老化对猕猴中颞视区细胞早期方向选择性的影响……
……梁　振, 陈月明, 孟　雪, 王　奕, 周宝琢, 谢莹莹, 何文胜 (498)
三种创伤弧菌免疫原的制备及其对黄姑鱼的免疫保护效果…… 闫茂仓, 单乐州, 陈少波, 谢起浪 (503)

综　述

非人灵长类位置行为的辐射适应与研究进展 ……
……张　晶, 齐晓光, 张　堪, 张　培, 郭松涛, 魏　玮, 李保国 (511)
Cathelicidins 家族抗菌肽研究进展 …… 广慧娟, 厉　政, 王义鹏, 赖　仞, 于海宁 (523)
大脑皮层内活动依赖的神经环路结构可塑性研究进展…… 饶小平, 许智祥, 徐富强 (527)
髓系单核细胞来源的 HIV-1 限制性因子——SAMHD1 …… 李佩璐, 陈倩倩, 张驰宇 (537)

简　报

中国兽类鼩鼱科一新纪录——高氏缺齿鼩 …… 何　锴, 邓　可, 蒋学龙 (542)
中国鸟类鸻科新纪录种——白尾麦鸡 …… 丁进清, 马　鸣 (545)

会议消息

2012 年昆明秀丽线虫研讨会顺利召开 …… (510)

研究团队推荐

遵义医学院器官移植实验室学科团队简介 …… (432)
宁波大学海洋学院海洋生物技术研究团队简介 …… (486)
西北大学生命科学学院秦岭川金丝猴研究中心简介…… (522)
中国科学院武汉物理与数学研究所神经影像实验室简介…… (536)

封面说明：中国鸟类新纪录种——白尾麦鸡 (*Vanellus leucurus*), 文见本期第 545 页。　丁进清　摄

[期刊基本参数] CN53-1040/Q * 1980 * b * A4 * 120* zh + en * P * ￥40.00 * 850 * 18 * 2012-10　　http://www.zoores.ac.cn